

Molekulare und evolutionäre Hintergründe der Kationenpermeation bei Mitgliedern der TRPM-Subfamilie



Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Janine Wäring
aus Rahden

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
15.08.2008 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. U. Homberg

Zweitgutachter: Prof. Dr. T. Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2008

Meiner unvergessenen
Oma Minna

1	EINLEITUNG	1
1.1	TRP-Kanäle	1
1.1.1	Struktur und Multimerisierung	4
1.1.2	Subfamilie der Melastatin-verwandten TRP-Kanäle – TRPM	5
1.1.2.1	TRPM7	6
1.1.2.2	TRPM6	9
1.1.2.3	TRPM2	11
1.1.2.4	TRPM8	13
1.1.2.5	Selektivität und Permeation in TRPM-Kanälen	14
1.1.3	Evolution von TRP-Proteinen	15
1.2	Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie	16
1.2.1	Magnesiumhomöostase	16
1.2.2	Ausprägung der HSH	21
1.2.3	TRPM6- und TRPM7-Proteine in Magnesiumhomöostase und HSH	22
1.2.3.1	Patient mit Aminosäureaustausch P1017R im TRPM6-Protein	25
1.3	Zielsetzung	27
2	MATERIAL UND METHODEN	28
2.1	Materialien	28
2.2	Zellphysiologische Arbeiten	28
2.2.1	Zellkultur	28
2.2.1.1	<i>Human embryonic kidney</i> (HEK) Zelllinie	28
2.2.1.2	Stabil exprimierende Zelllinien	29
2.2.1.3	Induktion stabiler Zelllinien	30
2.2.2	Transfektionen	30
2.2.2.1	Klone	30
2.2.3	Konfokale Mikroskopie	31
2.3	Molekularbiologische Methoden	31
2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA	31
2.3.1.1	Chemisch kompetente Zellen und Transformation	31
2.3.1.2	Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab	32
2.3.1.3	Plasmid-Präparation im mittleren Maßstab	32
2.3.2	Zielgerichtete Mutagenesen	32
2.3.2.1	Oligonukleotide zur Mutagenese	33
2.3.3	DNA-Analyse	34
2.3.3.1	Enzymatische Restriktion	34
2.3.3.2	Auftrennung der DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese	34
2.4	Funktionale Untersuchungen	34
2.4.1	Elektrophysiologische Messungen mittels <i>patch clamp</i> -Technik	34
2.4.1.1	Messtand	35
2.4.1.2	Pipettenherstellung	35
2.4.1.3	Ganzzellableitungen	36
2.4.1.4	Lösungen	37
2.4.2	Calciummessungen mittels Aequorin-Biolumineszenz	38
2.4.2.1	Vorbereitung der Zellen	39
2.4.2.2	Messvorgang	40
2.4.2.3	Lösungen	41
2.4.3	Auswertungen	41
2.4.3.1	Berechnungen und Statistik	41
2.4.3.2	Aminosäuresequenzvergleiche	42

3	ERGEBNISSE	44
3.1	Patientenmutante P1017R im TRPM6-Protein	44
3.1.1	Charakterisierung der Zelllinien	44
3.1.1.1	TRPM7 ^{pIND}	45
3.1.1.2	TRPM6 ^{pIND}	49
3.1.1.3	Zelllinien im Vergleich	52
3.1.2	HSH-Mutation P1017R im TRPM6-Protein	54
3.1.2.1	Funktionelle Analyse in <i>patch clamp</i> -Experimenten	54
3.1.2.2	Das Äquivalent im TRPM7-Protein: P1040R	56
3.1.2.3	Einfluss auf endogenen MIC-Ströme	58
3.1.2.4	Oberflächenexpression der TRPM6- und TRPM7-Varianten	61
3.2	Funktionelle und phylogenetische Analyse von TRPM-Proteinen.....	63
3.2.1	Funktionelle Charakterisierung gezielter Mutationen im TRPM7	63
3.2.1.1	Permeabilität des TRPM7-Kanals für monovalente Kationen.....	64
3.2.1.2	Strom-Spannungs-Beziehungen und Divalentenpermeation.....	66
3.2.1.3	Verschiedenen Glutamat- und Tyrosinmutationen	71
3.2.1.4	Block des TRPM7-Kanals durch intra- und extrazelluläre divalente Kationen.....	75
3.2.1.5	Transienter Einwärtseffekt durch Magnesium	81
3.2.2	Reziproke Mutationen im TRPM2-Protein	84
3.2.3	Reziproke Mutationen im TRPM8-Protein	86
3.2.4	Phylogenetische Analyse der TRPM-Subfamilie	88
3.2.4.1	TRPM-Gene in verschiedenen Entwicklungsstufen	88
3.2.4.2	Modell der Evolution von TRPM-Proteinen	90
4	DISKUSSION.....	93
4.1	Patientenmutanten.....	93
4.1.1	Zelllinien und Transfektionen	94
4.1.2	P1017R und andere Mutationen im TRPM6-Protein	98
4.1.3	Klinisch-genetische Hintergründe der Krankheitsausprägung	99
4.1.4	Funktionelle Aspekte zu TRPM6- und TRPM7-Kanälen.....	101
4.2	Porenmutanten.....	103
4.2.1	Divalentenpermeation in TRP-Kanälen	104
4.2.1.1	Reziproke Aminosäureaustausche im TRPM2- und TRPM8-Protein	107
4.2.2	Weitere Glutamat- und Tyrosin-Mutationen	108
4.2.3	Inhibition der TRPM7-Kanalaktivität durch Magnesiumionen	109
4.2.3.1	Bindungsstellen für intrazelluläres Magnesium	109
4.2.4	Versuchsbedingungen	110
4.2.4.1	Aequorinmessungen.....	111
4.2.5	Evolutionäre Hintergründe der Struktur und Permeabilität von TRPM-Kanälen	112
5	ZUSAMMENFASSUNG	115
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	117
7	ANHANG	128

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampère
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
ADP-Ribose	Adenosindiphosphatribose
AS	Aminosäure
ATP	Adenin-5'-triphosphat
BAPTA	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
bp	Basenpaar(e)
c	Konzentration
C-	Carboxyl-
C-Terminus	carboxyterminales Proteinende
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre freie Konzentration zweiwertiger Calciumionen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary DNA</i>)
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
eGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein (enhanced GFP)
eYFP	verbessertes gelb fluoreszierendes Protein (enhanced YFP)
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein (aus <i>Aequorea victoria</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HBS	<i>hepes buffered saline</i>
HEDTA	Hydroxyethylethylendiamintriessigsäure
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-(2-ethanesulphonic acid)
Hz	Hertz
IC ₅₀	Konzentration halbmaximaler Inhibierung
k	kilo
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	molar
m	milli oder Meter
$[Mg^{2+}]_i$	intrazelluläre freie Konzentration zweiwertiger Magnesiumionen
min	Minute(n)
μ	mikro
n	nano
N-	Amino-
NAD ⁺	Nikotinamidadeninnukleotid
NMDG	N-methyl-D-Glucamin
N-Terminus	aminoterminals Proteinende
Oligonukleotid	oligomeres Desoxyribonukleotid
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
p	pico oder Plasmid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
TRP	<i>transient receptor potential</i>
U	Unit (Einheit)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
WT	Wildtyp
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein)

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt.

1 EINLEITUNG

1.1 TRP-Kanäle

Die Familie der *transient receptor potential* (TRP) Kanäle besitzt aktuell mehr als 50 Mitglieder in allen phylogenetischen Entwicklungsstufen (Nilius und Voets, 2005), davon allein fast 30 in Säugetieren (Maruyama et al., 2007). Der Name dieser Familie leitet sich von dem ersten gefundenen Vertreter ab, einem 1969 beschriebenen Genprodukt in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Eine Mutation in diesem Gen führte in Photorezeptorzellen auf einen konstanten Lichtreiz hin zu einer transienten statt der üblichen persistenten Aktivierung eines Calciumeinstroms (Cosens und Manning, 1969; Montell und Rubin, 1989). Die Mitglieder werden aufgrund von Sequenzhomologien in sieben Subfamilien unterteilt: TRPC, TRPV, TRPM, TRPN, TRPA, TRPP und TRPML (Abb. 1.1). Innerhalb der TRP-Familie zeigt sich eine große Bandbreite an Expressionsmustern sowie unterschiedlichste Aktivierungs- und Regulationsmechanismen. Im Tierreich sind TRP-Proteine in sämtlichen Stufen von Einzellern bis zu Säugetieren vertreten, sogar in Hefen konnten inzwischen Proteine identifiziert werden (Palmer et al., 2001; Denis und Cyert, 2002), die durch Sequenzhomologien den TRP-Kanälen zugeordnet werden. So beinhaltet die Klassifikation in neueren Veröffentlichungen bereits eine weitere Subfamilie der TRPY-Proteine (yeast) (Venkatachalam und Montell, 2007).

Allen TRP-Proteinen ist gemein, dass sie aus sechs Transmembrandomänen bestehen, mit intrazellulären Amino- und Carboxytermini und einer porenbildenden Region zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne (Heginbotham et al., 1992; Doyle et al., 1998; Clapham et al., 2001; Montell et al., 2002a). Diese Grundeigenschaften teilen sie mit den spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Yellen, 2002), und viele der für Kaliumkanäle gewonnenen Erkenntnisse konnten für TRP-Kanäle bestätigt werden. Wie Kaliumkanäle bilden auch TRP-Proteine als Tetramere Kationenkanäle, die unterschiedliche Selektivitäten für ein- und zweiwertige Kationen oder bestimmte Ionenarten aufweisen. Verschiedene TRP-Proteine sind in Krankheiten involviert oder wurden sogar im Rahmen der Erforschung bestimmter Krankheiten entdeckt (siehe dazu Nilius et al., 2005b).

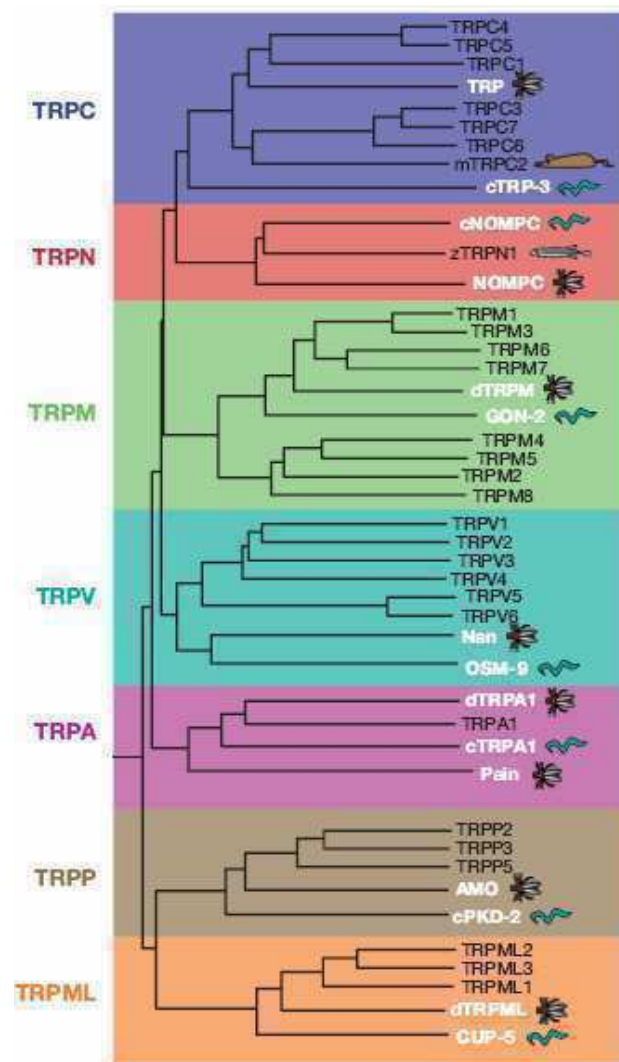


Abb. 1.1: Stammbaum der TRP-Proteine

Phylogenetischer Stammbaum der sieben Subfamilien der TRP-Kanäle mit den Vertretern im Menschen in schwarzer Schrift. Zusätzlich ist jeweils ein homologes Protein aus *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* in weißer Schrift und mit dem entsprechenden Symbol angezeigt: NOMPC (*no mechanoreceptor potential C*); GON (*abnormal gonad development*); NAN (*nanchung*); OSM (*osmotic avoidance abnormal*); Pain (*painless*); AMO (*almost there*); PKD (*polycystic kidney disease*); CUP (*coelomocyte uptake defective*). TRPC2 existiert im Menschen nur als Pseudogen und ist deswegen mit m (*mouse*) und einem Symbol gekennzeichnet. Zudem ist als einziger TRPN jener aus dem Zebrafisch *Danio rerio* gezeigt, induziert durch ein „z“ und das Fischesymbol. (aus Venkatachalam und Montell, 2007)

Die kanonischen (*canonical*) oder klassischen TRP-Kanäle beinhalten die ersten klonierten Vertreter der TRP-Familie in Vertebraten und weisen die höchste Homologie zu den TRP-Kanälen in *Drosophila* auf. Diese Subfamilie enthält sieben Mitglieder, die in vier Gruppen unterteilt werden: TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 und TRPC4/5, wobei TRPC2 im Menschen lediglich ein Pseudogen ist (Carter et al., 2006). TRPC-Proteine bilden nichtselektive, calciumpermeable Kationenkanäle (Clapham et al., 2003), die rezeptorgesteuert und Phospholipase C-abhängig

aktiviert werden können (Montell, 2005). Einige TRPC-Kanäle wie TRPC1 und TRPC6 reagieren aber möglicherweise auch auf mechanische Reize wie Membrandehnung oder osmotischen Druck (Maroto et al., 2005; Spassova et al., 2006), dieser Sachverhalt wird aber zur Zeit kontrovers diskutiert, da die Aktivierung selbst rezeptorvermittelt sein könnte (Sharif-Naeini et al., 2008; Mederos und Storch et al., in Revision). Insbesondere für TRPC1- und TRPC4-Kanäle wird auch eine Aktivierung durch die Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher beschrieben (zusammengefasst in Venkatachalam et al., 2002). Für TRPC-Kanäle wird eine Beteiligung in vielen physiologischen Zusammenhängen wie z.B. bei der Kontraktion glatter Muskelzellen vermutet, die genaue Rolle im Organismus ist aber noch unklar (siehe auch Soboloff et al., 2007).

Für die Mitglieder der Subfamilie der TRPV-Kanäle war die Aktivierbarkeit des ersten gefundenen Vertreters, TRPV1, durch bestimmte aromatische Substanzen namensgebend, die eine Vanilloid-Struktur aufweisen. Darunter fällt z.B. der bekannteste Aktivator Capsaicin (TRPV1; Caterina et al., 1997). Weitere wirksame Substanzen, die ebenfalls den Eindruck von Schärfe oder Wärme vermitteln, sind Piperin (TRPV1; McNamara et al., 2005) und Campher (TRPV1/3; Moqrich et al., 2005; Xu et al., 2005). Im Gegensatz zu TRPC-Kanälen können TRPV-Kanäle durch pharmakologische Substanzen direkt aktiviert werden, weswegen sie auch als ionotrope Rezeptoren bezeichnet werden. Die Kanäle TRPV1 bis TRPV4 sind durch Temperaturerhöhungen aktivierbar, je nach Kanal durch moderate Temperaturen im Bereich von 27-39°C (TRPV3/4) oder hohe Temperaturen ($\geq 43^\circ\text{C}$, TRPV1) bis hin zu noxischer Hitze ($\geq 52^\circ$, TRPV2) (Caterina et al., 1997; Caterina et al., 1999; Bandell et al., 2007). Während TRPV5 und TRPV6 die höchste Calciumselektivität innerhalb der TRP-Kanäle aufweisen, sind die anderen Mitglieder nichtselektive Kationenkanäle (Montell et al., 2002a; Clapham et al., 2003). Für den TRPV5-Kanal wurde anhand von gendefizienten Mäusen gezeigt, dass er in der Niere an der Rückgewinnung von Calcium beteiligt ist (Hoenderop et al., 2003a).

Die Subfamilien mit den wenigsten Mitgliedern sind TRPA (*ankyrin*), TRPP (*polycystin*), TRPN (*no mechanoreceptor potential C*) und TRPML (*mucolipin*), die nur aus einem bis vier Mitgliedern bestehen. Sie haben geringere Sequenzhomologien zum *Drosophila*-TRP als die vorher beschriebenen Subfamilien, was sich teilweise auch in strukturellen Veränderungen wie einer besonders großen

extrazellulären Schleife zwischen der ersten und der zweiten Transmembrandomäne bei TRPP- und TRPML-Proteinen äußert (Venkatachalam und Montell, 2007).

Die jüngste beschriebene Subfamilie, TRPY (yeast), umfasst TRP-Proteine, die in Hefen zu finden sind (Venkatachalam und Montell, 2007). Die Tatsache, dass auch in einzelligen Organismen TRP-Proteine gefunden wurden, könnte erklären, wie die hohe Diversität innerhalb dieser Familie zustande kommen konnte. Mit der weiteren Beschreibung neuer Mitglieder und ihrer biophysikalischen Eigenschaften wird es in Zukunft interessante Anhaltspunkte für tiefere Einblicke in die Evolution dieser Kanalproteinfamilie geben.

1.1.1 Struktur und Multimerisierung

Neben den schon erwähnten Gemeinsamkeiten von TRP-Proteinen (s. Kapitel 1.1) haben die einzelnen Subfamilien noch charakteristische Besonderheiten. So gibt es genau lokalisierte Bereiche, in denen für bestimmte Kanäle typische Sequenzen zu finden sind (Abb. 1.2).

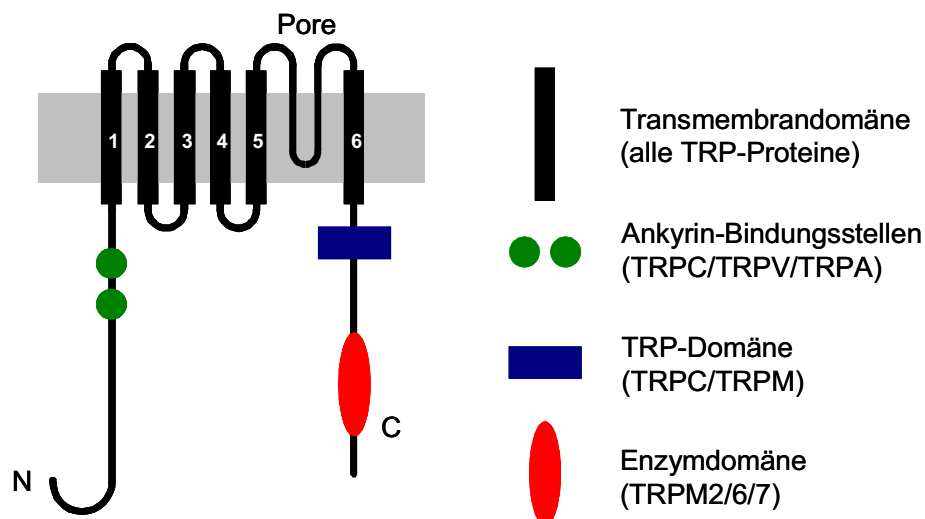


Abb. 1.2: Strukturelemente verschiedener TRP-Kanalproteine und ihre Positionierung innerhalb des Proteins.

Intrazelluläre C- und N-Termini, die Transmembrandomänen 1-6 und die porenbildende Region zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne finden sich bei allen TRP-Proteinen, andere Strukturen wie in der Legende angezeigt.

TRPC- und TRPM-Proteine besitzen die sogenannte TRP-Domäne, die an die sechste Transmembrandomäne anschließt. Diese enthält die TRP-Boxen 1 und 2, wobei Box 1 in TRPC-Proteinen unveränderlich ist und die Box 2 eine prolinreiche Region darstellt. TRPC-, TRPV-, TRPA- und TRPN-Proteine besitzen drei bis vier

aufeinanderfolgende, N-terminale Ankyrin-Bindungsstellen. Eine Besonderheit stellen die schon erwähnten C-terminalen Enzymdomänen von TRPM6-, TRPM7- und TRPM2-Proteinen dar (zusammengefasst in Venkatachalam und Montell, 2007). Auf der Kristallstruktur von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen basierende dreidimensionale Modelle und Strukturanalysen weisen eine große Ähnlichkeit zu TRP-Kanälen auf. Da für Kaliumkanäle bereits nachgewiesen wurde, dass vier Kanaluntereinheiten als Tetramer einen funktionellen Kanal bilden, bestand die Vermutung, dass auch TRP-Proteine tetramersieren (Liman et al., 1992; Clapham et al., 2001). Bei Kaliumkanälen besteht zudem die Möglichkeit einer Homomerisierung sowie einer Heteromerisierung unterschiedlicher Kanaluntereinheiten. Da viele nahe verwandte TRP-Kanäle in den gleichen Geweben exprimiert werden, ist auch die Formation heterotetramerer Kanäle prinzipiell möglich. Durch eine Heteromultimerisierung lassen sich die Kanaleigenschaften und somit die Möglichkeiten der Lokalisation, Selektivität und Regulation um ein vielfaches erweitern, da nicht zu erwarten ist, dass die heteromeren Komplexe völlig identische Eigenschaften mit den homomeren Kanälen besitzen (Venkatachalam und Montell, 2007). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass es zu einer Heteromultimerisierung von TRP-Kanaluntereinheiten kommen kann und dass dies auch in natürlichen Systemen stattfindet (Strubing et al., 2001; Goel et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Tobin et al., 2002; Chubanov et al., 2004; Li et al., 2006). Allerdings sind Studien über die Stöchiometrie in diesen Komplexen rar. Für TRPV5- und TRPV6-Proteine wurde mittels der Expression von Konstrukten, in denen verschiedene Kanaluntereinheiten miteinander fusioniert sind, gezeigt, dass sie in verschiedenen Verhältnissen zusammenfinden können und dabei unterschiedliche biophysikalische Eigenschaften ausbilden (Hoenderop et al., 2003b).

1.1.2 Subfamilie der Melastatin-verwandten TRP-Kanäle – TRPM

Die Subfamilie der TRPM-Kanäle besitzt mit acht Kanälen die meisten Mitglieder (Montell, 2003), die in vier Gruppen unterteilt werden: TRPM1/3, TRPM2/8, TRPM4/5 und TRPM6/7. Die Mitglieder bekamen ihren Namen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum ersten klonierten Protein dieser Familie, Melastatin (TRPM1), der als Tumorsuppressor identifiziert wurde (Duncan et al., 1998). Das TRPM1-Protein, von dem zwei Spleißvarianten existieren, bildet den einzigen Kanal dieser Subfamilie, für den noch keine elektrophysiologischen Daten ermittelt werden konnten. Allerdings

wurde gezeigt, dass in HEK293-Zellen, die TRPM1-Protein überexprimieren, das Calciumniveau innerhalb der Zellen höher ist als in nicht transfizierten Zellen (Xu et al., 2001).

Das mit TRPM1 am nächsten verwandte Protein ist der TRPM3. Für ihn wurden diverse Spleißvarianten gefunden, was ihm *in vivo* eine große Variabilität der Funktionen ermöglichen könnte (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003; Oberwinkler et al., 2005). Er bildet einen konstitutiv aktiven Kanal, dessen Spleißvarianten nichtselektiv oder hoch calcium- und magnesiumselektiv sind (Oberwinkler et al., 2005). Die Permeabilität der Spleißvariante TRPM3 α 2 aus der Maus ist 10-fach höher für Calcium bzw. 100-fach höher für Magnesium als beim TRPM3 α 1.

TRPM4 und TRPM5 sind ebenfalls nahe verwandte Proteine und in der Lage, heteromultimere Komplexe zu bilden. Sie sind die einzigen Mitglieder der TRPM-Subfamilie, die streng monovalent selektiv und somit impermeabel für Calcium und andere divalente Kationen sind. TRPM5-Protein wird in Geschmacksknospen exprimiert und durch die verschiedenen Geschmacksrichtungen süß, bitter und umami aktiviert, so dass ihm eine Beteiligung im Geschmacksempfinden zugeordnet wird (Perez et al., 2002; Zhang et al., 2003b). Dem TRPM4-Kanal wird eine Beteiligung am Calciumeinstrom in Mastzellen zugeschrieben und in TRPM4 defizienten Mastzellen wurden vermehrte allergietypische Reaktionen beobachtet. (Vennekens et al., 2007).

Die für die vorliegende Arbeit relevanten Kanäle werden im Folgenden genauer charakterisiert.

1.1.2.1 TRPM7

Drei verschiedene Arbeitsgruppen wurden etwa zeitgleich auf das TRPM7-Protein aufmerksam und benannten es jeweils unterschiedlich. Nadler et al. (2001) bezeichneten den daraus gebildeten Kanal als LTRPC7, weil er der Gruppe der *long transient potential channel* zugeordnet wurde (Nadler et al., 2001) während andere für das Protein die Bezeichnung TRP-PLIK (*phospholipase C interacting kinase*) wählten (Runnels et al., 2001). Die Gruppe um Alexey Ryazanov nannte es initial *melanoma kinase* und später ChaK 1 (*channel kinase*), in Anlehnung an eine Serine/Threonin-Proteinkinase am C-Terminus des Proteins (Ryazanova et al., 2001; Ryazanov, 2002). Diese Kinase ist in der Lage, Threonine und Serine zu phosphorylieren und bewirkt eine massive Autophosphorylierung des Kanals

(Runnels et al., 2001; Ryazanova et al., 2004; Matsushita et al., 2005), wobei aktuell 46 Autophosphorylierungsstellen beschrieben werden (Clark et al., 2008). Zudem findet eine die Phosphorylierung anderer Proteine wie Annexin I oder Myosin IIA statt, die vermutlich durch die Autophosphorylierung ermöglicht oder vereinfacht wird (Dorovkov und Ryazanov, 2004; Clark et al., 2006). Noch ist unklar, ob die Kinasedomäne für die Kanalfunktion essentiell ist (Nadler et al., 2001; Runnels et al., 2001; Schmitz et al., 2003). Eine Punktmutation, durch die die Phosphotransferaseaktivität der Kinasedomäne zerstört wurde, führte je nach Versuchsbedingungen zu Wildtyp-ähnlichen Aktivierungen oder nicht funktionellen Kanälen (Runnels et al., 2001; Schmitz et al., 2003). Zum jetzigen Zeitpunkt geht man davon aus, dass zumindest die Phosphotransferase-Aktivität der Kinasedomäne nicht grundsätzlich für die Kanalfunktion benötigt wird (Schmitz et al., 2003; Matsushita et al., 2005); bezüglich Kinasedomäne-defizienter Kanalproteine gibt es wiederum unterschiedliche Ergebnisse: Während einerseits ein zumindest partiell aktives Protein beschrieben wurde (Schmitz et al., 2003), konnten an anderer Stelle keine Ströme mehr detektiert werden (Matsushita et al., 2005).

Der TRPM7-Kanal leitet unter physiologischen Bedingungen vorzugsweise divalente Kationen wie Magnesium und Calcium (Monteilh-Zoller et al., 2003). Die Magnesiumpermeabilität des TRPM7 ist eine Besonderheit unter den TRP-Kanälen, es konnte jedoch gezeigt werden, dass der TRPM7-Kanal noch für eine weit größere Zahl an divalenten Kationen permeabel ist, darunter Ionen von physiologisch relevanten Spurenelemente. Dabei wurde folgende Abstufung bei den Permeabilitäten für die verschiedenen Kationen gefunden: $\text{Zn}^{2+} \approx \text{Ni}^{2+} \gg \text{Ba}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mg}^{2+} \geq \text{Mn}^{2+} \geq \text{Sr}^{2+} \geq \text{Cd}^{2+} \geq \text{Ca}^{2+}$. Trivalente Ionen können dagegen nicht geleitet werden (Monteilh-Zoller et al., 2003). Der Kanal ist konstitutiv aktiv, er wird aber stark durch freies intrazelluläres Magnesium, Magnesium-ATP und in einem ähnlichen Maße auch durch Magnesium-GTP gehemmt (Nadler et al., 2001; Demeuse et al., 2006). Der Wert der halbmaximalen Inhibierung (IC_{50}) durch intrazelluläre Magnesiumionen wurde auf etwa 720 μM bestimmt (Demeuse et al., 2006). Auch eine Regulation des TRPM7-Kanals durch Rezeptoraktivierung mittels muscarinischer Agonisten und nachfolgender Freisetzung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) wurde beschrieben (Takezawa et al., 2004), ebenso ein Einfluss von Phosphatidyl-Inositol 4,5-Bisphosphat (PIP2) (Runnels et al., 2002), wobei letzterer noch kontrovers diskutiert wird (Penner und Fleig, 2007). Die Annahme, dass ATP Kinase-

abhängig den Kanal aktiviert (Runnels et al., 2001), konnte widerlegt werden, da durch das ATP nur freies Magnesium in der Zelle gebunden und so ein verstärkte Kanalaktivität hervorgerufen wird (Nadler et al., 2001). Agonisten zur Aktivierung des Kanals wurden bis zum heutigen Tag noch nicht identifiziert, allenfalls fand man modulierende Effekte durch verschiedene Einflüsse wie Protonen (Jiang et al., 2005; Li et al., 2006; Li et al., 2007) sowie eine postulierte mechanische und osmotische Sensitivität des Kanals (Bessac und Fleig, 2007; Numata et al., 2007b; Numata et al., 2007a).

Bei funktionellen Analysen wird der Strom durch die Dialyse der Zelle mit magnesiumfreier Pipettenlösung aktiviert und erreicht nach 100-300 s ein Maximum mit nachfolgender Plateauphase. Die Strom-Spannungs-Beziehung des TRPM7-Kanals weist in Ganzzellmessungen minimale divalente Einwärtströme und im Verhältnis dazu enorme Auswärtströme auf, die durch monovalente Ionen getragen werden und besonders bei Potentialen über +50 mV zu der charakteristischen, stark auswärts rektifizierenden Strom-Spannungs-Beziehung führen. Da extrazellulär vorhandene divalente Kationen den Einstrom monovalenter Kationen verhindern, kommt es lediglich bei vollständiger Abwesenheit divalenter Kationen im Extrazellulärraum zum Influx großer monovalenter Kationenströme (Nadler et al., 2001).

In verschiedenen Studien wurden native, magnesiuminhibierbare Kationenströme, die in ihren Kanaleigenschaften sehr dem TRPM7 ähneln, beschrieben und MagNuM (*magnesium-nucleotide inhibited metal current*) (Nadler et al., 2001) bzw. MIC (*magnesium inhibited current*) (Prakriya und Lewis, 2002) benannt. Anschließend wurden diese Ströme in vielen verschiedenen Zelllinien gefunden und einvernehmlich dem TRPM7-Kanal zugeordnet. Allerdings steht noch der Beweis aus, dass MIC/MagNuM-Ströme wirklich exklusiv durch TRPM7 generiert werden und dass nicht andere Kanäle oder Heteromere aus verschiedenen Untereinheiten an der Bildung dieses Stroms beteiligt sind.

Das TRPM7-Protein wird in Säugern ubiquitär exprimiert und ist auch in vielen Zelllinien vorhanden. Vor kurzem zeigte eine Studie, dass unter 22 untersuchten Mitgliedern der TRP-Familie TRPM7 das Protein mit der weitestreichenden und stärksten Expression ist (Kunert-Keil et al., 2006). Die weitläufige Verbreitung des Kanals, seine Fähigkeit, Magnesium zu leiten und die gleichzeitige Regulation durch Magnesium brachten die Vermutung auf, dass dieser Kanal eine grundlegende

Aufgabe in magnesium-abhängigen zellulären Prozessen übernimmt. Tatsächlich scheint das TRPM7-Protein essentiell für die Überlebensfähigkeit einzelner Zellen sowie des gesamten Organismus zu sein. So führte das Ausschalten des TRPM7-Gens in einer B-Zelllinie aus dem Huhn (DT-40) zu anfänglichem Wachstumsstopp und nach 48-72 Stunden zum Zelltod (Nadler et al., 2001; Schmitz et al., 2003). Dabei konnte durch die Gabe hoher extrazellulärer Magnesiumdosen, nicht aber durch Calcium, die Lebensfähigkeit der Zellen erhöht werden, was die Annahme einer Beteiligung des TRPM7-Proteins am zellulären Magnesiumhaushalt untermauerte. Zudem war zusätzlich exprimiertes TRPM7-Protein aus Säugern in der Lage, den letalen Phänotyp der Zellen aufzuheben (Schmitz et al., 2003). Diesen Versuchen vorausgehend wurde festgestellt, dass es nach gezielten TRPM7-Gen-deletionen nicht möglich war, in dieser Zelllinie Klone zu finden, in denen beide Allele ausgeschaltet waren. Aus diesem Grund musste auf eine induzierbare Deletion der Gene zurückgegriffen werden (Nadler et al., 2001). Entsprechend dazu gelang es bisher auch nicht, eine TRPM7-gendefiziente Maus zu generieren, da der homozygote Genotyp im frühen embryonalen Stadium letal ist (Penner und Fleig, 2007). Im Zebrafisch *Danio rerio* führte eine Mutation im TRPM7-Ortholog zu Beeinträchtigungen in der Entwicklung des Skeletts und schweren Wachstumsstörungen, wobei zu bedenken ist, inwiefern die physiologische Rolle des TRPM7-Proteins in einfacheren Organismen auf die Verhältnisse in Säugetieren übertragen werden können. Jedoch schädigt auch die Überexpression des Kanals die Zellen, nach spätestens 72-96 Stunden begannen TRPM7-Protein stabil exprimierende Zellen anzuschwellen, sich abzulösen und zu sterben (Nadler et al., 2001; Su et al., 2006).

1.1.2.2 TRPM6

Das TRPM6-Protein wurde 2001 auf der Suche nach Homologen der *elongation factor II* Kinase (eEF-2) zeitgleich mit dem nahe verwandten TRPM7-Protein entdeckt und auf Grund des Expressionsmusters KK (*kidney kinase*) und nachfolgend ChaK 2 genannt (Ryazanova et al., 2001; Ryazanov, 2002), während andere Gruppen das Protein im Rahmen einer vorgeschlagenen, allgemeingültigen Nomenklatur LTRPC6 nannten (Harteneck et al., 2000; Nadler et al., 2001).

Im Jahr 2002 konnten gleich zwei Studien eine Beteiligung des TRPM6 an der Ausprägung der autosomal rezessiv vererbten Krankheit Hypomagnesiämie mit

sekundärer Hypocalciämie (HSH) feststellen (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002) (s. Kapitel 1.2.3).

Das TRPM6-Protein ist das am engsten mit dem TRPM7 verwandte Protein und besitzt ebenso wie dieses eine C-terminale Serin/Threonin-Proteinkinasedomäne. Man geht davon aus, dass die beiden Proteine als Heteromere zu funktionellen Kanalkomplexen zusammenkommen können. Bei Koexpression der beiden Kanäle konnte eine deutliche Amplifikation der TRPM7-typischen Ströme nachgewiesen werden (Chubанov et al., 2004). Es ist noch nicht geklärt, ob der TRPM6 auch alleine funktionsfähige homomere Kanäle bilden kann. Während verschiedene Studien funktionelle Daten zum TRPM6 präsentieren (Voets et al., 2004b; Li et al., 2006; Li et al., 2007; Topala et al., 2007), konnten andere weder in Säugetier-Zelllinien noch in Oocyten aus *Xenopus laevis* Ströme messen, die durch homomere TRPM6-Kanäle generiert wurden. Zudem konnte das TRPM6-Protein erst nach Koexpression mit TRPM7 in der Zellmembran detektiert werden (Chubанov et al., 2004; Schmitz et al., 2005).

Dem TRPM6-Kanal werden ähnliche Eigenschaften wie dem TRPM7-Kanal zugewiesen, so z.B. die stark auswärts rektifizierende Strom-Spannungs-Beziehung in Ganzzellmessungen mit geringen divalenten Einwärtsströmen und großen monovalenten Auswärtsströmen. Zudem haben beide Kanäle die Fähigkeit, Calcium und Magnesium zu leiten und sind durch intrazelluläres Magnesium inhibierbar. Interessanterweise ist die Magnesium-Leitfähigkeit des TRPM6-Kanals fünffach höher als die des TRPM7. Auch im TRPM6-Kanal blockieren extrazelluläre divalente Kationen monovalente Einwärtsströme, so dass es bei divalentenfreier Badlösung zur Entwicklung großer monovalenter Einwärtsströme kommt (Nadler et al., 2001; Voets et al., 2004b). Weiterhin wurde für beide Kanäle eine pH-Sensitivität nachgewiesen, die aber beim TRPM6-Kanal schwächer ausgeprägt ist. Dabei führt ein Absenken des pH-Wertes zu größeren Einwärts- und Auswärtsströmen (Li et al., 2006). Es sind aber auch Unterschiede in den Eigenschaften der Kanäle zu finden. So wurde unter anderem in Einzelkanalmessungen gezeigt, dass sich die Kanäle in ihrer Einzelkanalamplitude unterscheiden und dass es Unterschiede von heteromeren TRPM6/7-Kanalkomplexen im Gegensatz zu den jeweiligen Homomultimeren gibt. Zudem bewirken mikromolare Konzentrationen 2-Aminoethoxid-Diphenylborat (2-APB) eine Potenzierung der TRPM6-Kanalaktivität, während es den TRPM7-Strom inhibiert (Li et al., 2006).

Im Gegensatz zur ubiquitären Expression des TRPM7-Proteins wird das TRPM6-Protein fast exklusiv in Niere und Darm und in geringerer Menge auch in Lunge und Hoden exprimiert (Schlingmann et al., 2002; Chubanov et al., 2004; Groenestege et al., 2006). Dieses Expressionsmuster sowie die Beteiligung des Proteins an der HSH unterstützen die Annahme, dass der TRPM6-Kanal am Magnesiumtransport in die Epithelzellen von Darm und Niere beteiligt und somit verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Magnesiumgleichgewichts im menschlichen Organismus ist. Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass die Expression des TRPM6-Gens durch die Menge des oral aufgenommenen Magnesiums reguliert wird (Groenestege et al., 2006) und dass sie vom Säure-Base-Haushalt des Organismus abhängt. So ist die Expression des TRPM6-Proteins bei einer Übersäuerung des Körpers herabgesetzt (Nijenhuis et al., 2006), übereinstimmend mit einem schon früher beobachteten renalen Magnesiumverlust bei Übersäuerung des Organismus (Martin und Jones, 1961; Lennon und Piering, 1970; Blumberg et al., 1998).

Das TRPM6-Gen besitzt 39 Exons und es besteht die Möglichkeit eines alternativen Spleißens. So wurden z.B. drei alternative erste Exons gefunden (Chubanov et al., 2004), wobei noch nicht klar ist, ob diese verschiedenen Varianten sich in ihren biophysikalischen Eigenschaften unterscheiden oder unterschiedliche physiologische Relevanzen haben. Es bleibt auch noch aufzuklären, welche genaue Rolle TRPM6- und TRPM7-Proteine auf physiologischer Ebene spielen. Sie scheinen jedoch nicht exakt die gleichen Aufgaben im Organismus zu übernehmen, denn trotz ähnlicher Fähigkeiten der Kanäle war überexprimiertes TRPM6-Protein nicht in der Lage, das Absterben TRPM7-defizienter DT-40-Zellen zu verhindern (Schmitz et al., 2005). Entsprechend kann das ubiquitär exprimierte TRPM7-Protein nicht die Funktion des in der Niere fehlenden TRPM6-Kanals in HSH-Patienten übernehmen.

1.1.2.3 TRPM2

Neben TRPM6 und TRPM7 ist der TRPM2 das dritte Protein aus der Familie der TRP-Kanäle, das eine carboxyterminale Enzymdomäne besitzt. Es handelt sich hierbei um eine Struktur, die große Homologie zu NUDT9 (*nucleoside diphosphate-linked moiety X-type motif 9*), einer mitochondrialen ADP-Ribose Pyrophosphatase, besitzt und demzufolge als Nudix-Domäne bezeichnet wird. Die ursprünglichen Bezeichnungen des Kanals lauteten TrpC7 (mangels genauerer Unterteilung der TRPs zu dieser Zeit) (Nagamine et al., 1998) und LTRPC2 (*long transient receptor potential channel*) aufgrund seiner durch die Enzym-Domäne bedingten Länge

(Harteneck et al., 2000). Diese Domäne ermöglicht durch die Bindung von ADP-Ribose die Aktivierung des Kanals (Perraud et al., 2001; Kuhn und Luckhoff, 2004), wobei hierfür intrazelluläres Calcium benötigt wird, welches die Dosis-Wirkungskurve der ADP-Ribose stark nach links verschiebt (Perraud et al., 2001; McHugh et al., 2003). Gleiches gilt im geringeren Maße für zyklische ADP-Ribose (Kolisek et al., 2005). Des weiteren erfolgt eine Aktivierung des Kanals durch NAD^+ (Nicotinamid-Adeninnukleotid) (Sano et al., 2001; Hara et al., 2002; Heiner et al., 2003; Inamura et al., 2003; Kuhn und Luckhoff, 2004), allerdings gelingt dies nicht in allen Zelltypen (Wehage et al., 2002). Der Kanal wird außerdem durch oxidativen Stress aktiviert, der durch die Applikation von Wasserstoffperoxid in der Badlösung simuliert werden kann (Hara et al., 2002; Wehage et al., 2002; Inamura et al., 2003). Wasserstoffperoxid stellt somit den einzigen bekannten extrazellulär applizierbaren Stimulus zur Aktivierung des TRPM2-Kanals dar. Dabei wird vermutet, dass das Wasserstoffperoxid zur Aktivierung des Kanals führt, indem es eine Erhöhung der intrazellulären ADP-Ribose-Konzentration bewirkt, wie es als Reaktion auf oxidativen Stress bereits bekannt ist (Ame et al., 2004).

Nach der Aktivierung entwickelt der Kanal große Ströme mit einem Umkehrpotential nahe Null und einer fast linearen Strom-Spannungs-Beziehung, die es sehr schwierig macht, ihn von möglichen Leckströmen zu unterscheiden (Perraud et al., 2001). Die Permeabilität von Calcium- im Vergleich zu Natriumionen beträgt 0,6-0,7, somit handelt es sich um einen Kationenkanal mit geringer Selektivität (Sano et al., 2001; Kraft et al., 2004) auf (Perraud et al., 2001).

Das TRPM2-Gen wird weitläufig exprimiert, so z.B. in Blutzellen und vielen Neuronen, im Gehirn, Darm und im Pankreas. Es wird auch in Zellen des Immunsystems exprimiert und native TRPM2-Ströme konnten in verschiedenen daraus generierten Zelllinien gemessen werden (Sano et al., 2001; Heiner et al., 2003; Inamura et al., 2003; Gasser et al., 2006), so dass ihm auch eine Rolle bei der Immunantwort zugeschrieben wird. Übereinstimmend mit seiner Expression im Gehirn wurde kürzlich festgestellt, dass eine bipolare Störung mit einer Mutation im TRPM2-Gen zusammenhängt (McQuillin et al., 2006; Xu et al., 2006). Aufgrund seiner Aktivierbarkeit durch Wasserstoffperoxid scheint er auch bei der Reaktion auf oxidativen Stress und dem so induzierten Zelltod beteiligt zu sein. Mit der Aktivierung durch oxidativen Stress erfolgt eine Depolarisation durch einfließendes Natrium, die

einen wichtigen regulatorischen Faktor in bestimmten Zellen darstellen könnte (Zhang et al., 2003a; Fonfria et al., 2005; Zhang et al., 2006).

1.1.2.4 TRPM8

Das TRPM8-Protein ist der nächste Verwandte des TRPM2, es wurde beim Durchsuchen einer cDNA-Bank aus Prostatagewebe gefunden und erhielt zunächst den Namen TRP-p8 (Tsavaler et al., 2001). Tatsächlich ist die Prostata auch der Hauptexpressionsort des Proteins und seine Expression wird bei Prostatakrebs und anderen Krebsformen wie Brust-, Lungen- Darm- und Hauttumoren hochreguliert. Transkripte des Gens wurden aber auch in verschiedenen Ganglien, sensorischen Neuronen, vaskulären glatten Muskelzellen, Blasenepithel, im Magen und in der Leber gefunden. Die ersten funktionellen Daten zeigten, dass das - inzwischen von Montell und Kollegen TRPM8 benannte (Montell et al., 2002b) - Protein einen nichtselektiven, temperatursensitiven Kanal bildet, der durch Kälte und natürliche kältevermittelnde Substanzen, wie Menthol und Eukalyptol, aber auch durch synthetische Stoffe wie Icilin oder Frescolat aktiviert werden kann. Dabei konnten Chuang et al. (2004) zeigen, dass Icilin, anders als Kälte oder Menthol, den Kanal nur in der Gegenwart von intrazellulärem Calcium aktivieren kann (Chuang et al., 2004).

Die in *patch clamp*-Experimenten gewonnenen Daten zeigen eine Strom-Spannungs-Beziehung mit moderaten Einwärts- und prominenten Auswärtsströmen und einem Umkehrpotential nahe Null. Der TRPM8-Kanal ist sowohl für verschiedene monovalente Ionen als auch für Calciumionen permeabel, dabei hat er eine Präferenz für letzteres, die Permeabilität im Vergleich zu Natrium liegt bei 3,2 (McKemy et al., 2002). Eine andere Studie bestimmt den Wert auf 0,97, womit der Kanal wieder nahezu unselektiv wäre (Peier et al., 2002). Zwischen verschiedenen monovalenten Ionen wie Natrium, Kalium und Cäsium wird dagegen kaum diskriminiert. Der Kanal zeigt nach der Applikation eines Agonisten eine schnelle Aktivierung, desensitisiert aber dann in der Gegenwart des Stimulus, wobei diese Stromabnahme abhängig von extrazellulärem Calcium ist (Peier et al., 2002). Befindet sich kein Calcium in der extrazellulären Lösung, bleiben etwa 90% des Stromes erhalten (McKemy et al., 2002).

Als Rolle des TRPM8-Kanals im Säugerorganismus wird an erster Stelle die eines Kälte- und Schmerzensors gesehen. Zudem wird angenommen, dass er für das Überleben und Wachstum von Tumorzellen verantwortlich sein könnte. Es konnte

gezeigt werden, dass in einer Krebszelllinie die Unterdrückung der Kanalaktivität durch siRNAs oder Antagonisten zum Absterben der Zellen führte. Gleichzeitig war aber auch eine starke Stimulierung des Kanals durch Menthol toxisch für die Zellen, vermutlich aufgrund einer Überladung mit Calcium (Zhang und Barritt, 2004).

Das TRPM8-Protein könnte somit in der Zukunft einen neuen Tumormarker für die Diagnose von Prostatakrebs und anderen Krebsarten darstellen (Tsavaler et al., 2001; Fuessel et al., 2003).

1.1.2.5 Selektivität und Permeation in TRPM-Kanälen

Selektivitäten und Permeationseigenschaften von Kanälen auf molekularer und struktureller Ebene zu verstehen ist ein unverzichtbarer Bestandteil der Aufklärung ihrer biologischen Funktionen. Obwohl die Diversität der TRP-Kanäle in Bezug auf die Kationenselektivitäten ohnehin schon beeindruckend ist, tritt sie innerhalb der TRPM-Subfamilie noch auffälliger zutage. Während bei den Mitglieder der TRPC- und TRPV-Subfamilien nur eine variierende Permeabilität und Selektivität für Calcium zu finden ist, bietet die Melastatin-Subfamilie eine erstaunliche Variabilität von Kanälen. Die Selektivitäten reichen von monovalent selektiv beim TRPM4- und TRPM5-Kanal über Kanäle ohne Präferenzen (TRPM2/8) bis hin zu Kanälen, die hauptsächlich divalente Kationen leiten und nur unter besonderen Bedingungen vermehrt monovalente Kationen permeieren (TRPM3/6/7) (Owsianik et al., 2006). Der TRPM3-Kanal stellt in dieser Zuordnung einen Sonderfall dar. Grundsätzlich wurde er als nicht-selektiver Kationenkanal angesehen, allerdings existiert von ihm eine Spleißvariante (Variante TRPM3 α 2), die eine hohe Calciumselektivität aufweist. Die nichtselektive Variante wird durch TRPM3 α 1 repräsentiert (Oberwinkler et al., 2005). Diese Auffälligkeiten in den natürlichen Selektivitäten verschiedener Spleißvarianten sind natürlich ein wichtiges Werkzeug, um Erkenntnisse über die molekularen Hintergründe der diversen Permeationseigenschaften zu gewinnen.

In TRP-Proteinen befindet sich die porenbildende Region zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne und Aminosäuresequenzanalysen zeigen hohe Homologien zwischen den TRPM-Proteinen in diesem Bereich (Owsianik et al., 2006). Zudem zeigen viele Studien, dass Aminosäuren oder bestimmte Aminosäurereste in diesem Bereich wichtig oder sogar essentiell für die Permeation dieser Kanäle sind. Dabei sind besonders negativ geladene Aminosäurereste vielversprechende Kandidaten für eine Beteiligung an der Permeation, da diese in direkte Interaktion mit den positiv geladenen Kationen treten können. Durch die

tetramere Anordnung der Kanaluntereinheiten ergibt sich somit ein Ring negativ geladener Aminosäurereste um die Pore. Dies wurde zunächst für Calciumkanäle gezeigt und im folgenden auch für TRP-Kanäle übernommen (Yang et al., 1993; Ellinor et al., 1995; Garcia-Martinez et al., 2000; Nilius et al., 2001; Jung et al., 2003; Voets et al., 2004a; Liu et al., 2007). So konnte gezeigt werden, dass ein Glutamat an Position 977 essentiell für die Selektivität des TRPM4-Kanals ist. Beim Austausch des Glutamats durch Glutamin an dieser Position konnte sogar die Permeabilität dieses rein monovalent selektiven Kanals hin zu einer moderaten Permeation von divalenten Kationen geändert werden (Nilius et al., 2005a). In dieser Arbeit wurde auch ein Abschnitt (⁹⁸¹EDMDVA⁹⁸⁶) innerhalb des TRPM4-Proteins beschrieben, der als Selektivitätsfilter hauptverantwortlich für die Permeationseigenschaften des Kanals sein soll. TRPM6 und TRPM7 sind die einzigen Kanäle, die neben Calcium- auch Magnesiumionen sowie eine Vielzahl von Spurenelementen leiten können. Die Fähigkeit, Magnesiumionen zu leiten, stellt eine einzigartige Besonderheit dar, die innerhalb der TRP-Kanäle dem TRPM7, TRPM6 und der Spleißvariante $\alpha 2$ des TRPM3 vorbehalten ist (Nadler et al., 2001; Runnels et al., 2001; Voets et al., 2004b; Oberwinkler et al., 2005; Li et al., 2006). Magnesiumionen sind schwer zu leiten, da sie stark polarisierend sind und in Lösung eine große Hydrathülle besitzen (Flatman, 1984). Topala et al. konnten zeigen, dass ein Glutamatrest im vermuteten Porenbereich an Position 1024 eine wichtige Aufgabe bei der Permeation des TRPM6-Kanals haben muss, da eine Substitution dieser Aminosäure mit Alanin zu einem Funktionsverlust des Kanals führte. Zudem wurde der Einfluss eines weiteren Glutamins an Position 1029 sowie des Aspartats 1031 nachgewiesen. Die Gruppe definierte den Selektivitätsfilter des TRPM6 somit in der Region ¹⁰²⁹GEIDVC¹⁰³³ (Topala et al., 2007). Auch für andere Mitglieder der TRP-Familie konnte eine Beteiligung negativ geladener Aminosäuren an den Permeationseigenschaften gefunden werden (Garcia-Martinez et al., 2000; Nilius et al., 2001; Voets et al., 2002; Jung et al., 2003).

1.1.3 Evolution von TRP-Proteinen

Über die molekulare Evolution von TRP-Proteinen ist nicht allzuviel bekannt, da lange Zeit die Sequenzvergleiche auf wenige Vertebraten sowie die Modellorganismen *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* beschränkt waren (Harteneck et al., 2000; Vriens et al., 2004; Saito & Shingai, 2006). Erst mit der

Sequenzierung der Genome immer neuer Arten oder Teilen davon bietet sich die Möglichkeit, verlässliche phylogenetische Analysen der verfügbaren Gensequenzen durchzuführen.

Lediglich die Studie von Saito und Shingai (2006) beschäftigte sich dabei ausgiebig mit der Evolution von thermosensitiven TRP-Kanälen aus den Subfamilien TRPV, TRPM und TRPA, allerdings beschränkten sich die Untersuchungen auf Kanäle aus Vertebraten. Dabei fanden sie heraus, dass thermosensitive Kanäle schon in dem gemeinsamen Vorfahren von Fischen und Tetrapoden vorgekommen sein müssen. Durch Genduplikationen kam es dann zu einer Vervielfachung der Kanalproteine. Für TRPV4 konnte gezeigt werden, dass der Krallenfrosch *Xenopus tropicalis* sechs Genkopien besitzt, von denen eine die ursprüngliche Funktion des TRPV4-Kanals behalten hat, während die anderen Kanäle bereits leicht veränderte Eigenschaften aufweisen. In einigen Arten wie z.B. Zebrafisch und Kugelfisch ist es dann aber wieder zum Verlust einzelner Gene (in diesem Fall TRPV2, TRPV3 und TRPM8) gekommen, so dass die untersuchten Spezies ein jeweils individuelles Repertoire an thermosensitiven Kanälen aufweisen. Hier wurde auch ein Augenmerk auf die Lokalisation und Anzahl der jeweiligen Kanalgene gelegt, um Rückschlüsse auf die Art der Genduplikation ziehen zu können.

Es konnten in dieser Studie keine thermosensitiven TRPM-Proteine in *D. melanogaster*, *C. elegans* sowie dem Tunikaten *Ciona intestinalis* gefunden werden. Daraus wurde der Rückschluss gezogen, dass diese Kanäle erst nach der Aufspaltung von Urchordaten und Vertebraten entstanden sind, wobei sich zuerst die TRPM2- und TRPM8-Proteine entwickelt haben sollen und erst später TRPM4- und TRPM5-Proteine.

1.2 Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie

1.2.1 Magnesiumhomöostase

Magnesium ist als vierthäufigstes Kation im humanen Organismus ein unverzichtbarer Bestandteil, sei es als Strukturelement in Proteinen und Nukleinsäuren, als Co-Faktor von Enzymen oder als Modulator von Rezeptor- und Kanalaktivitäten. Es spielt somit eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus, der ATPase-Aktivität und von Stoffwechselprozessen (Romani und Scarpa, 2000; Konrad et al., 2004; Voets et al., 2004b; Romani, 2007). Sowohl auf zellulärer Ebene als auch den gesamten

Organismus betreffend werden Sollwerte für die Magnesiumkonzentrationen durch verschiedene Regelmechanismen eingehalten.

Auf Ebene des Gesamtorganismus ist ein Zusammenspiel von intestinaler Absorption und renaler Exkretion für die Magnesiumhomöostase verantwortlich (Romani, 2007). Für die Magnesiumaufnahme aus dem Darm- oder Nephronlumen gibt es prinzipiell zwei Wege: den parazellulären und den transzellulären Weg (Fine et al., 1991; Kerstan und Quamme, 2002). Der parazelluläre Transport ist ein passiver Transport, der von den Magnesiumkonzentrationen des Nahrungsbreis sowie des Primärharns und von der transepithelialen Potentialdifferenz abhängt. Er verläuft über die Zell-Zell-Verbindungen (*tight junction*) zwischen den Darmepithelzellen und es wird allgemein angenommen, dass Paracellin-1 (auch Claudin-16 genannt) eines der beteiligten Proteine an diesen Verbindungen ist und somit eine wichtige Komponente für die Magnesium- und auch Calciumabsorption im Darm darstellt (Simon et al., 1999; Blanchard et al., 2001). Der transzelluläre Weg hingegen ist kaum aufgeklärt. Für einen Transport vom Darm- oder Nephronlumen in die interstitielle Flüssigkeit ist sowohl ein apikaler Transport ins Zelllumen als auch ein basolateraler Transport der Magnesiumionen aus den Zellen notwendig. Am Einstrom der Ionen in die Zelle ist ein spezifischer Ionenkanal beteiligt, der durch den elektrochemischen Gradienten zwischen Lumen und Zellinnerem angetrieben wird (Schlingmann und Gudermann, 2005; Schlingmann et al., 2007). Durch die Beteiligung des TRPM6-Kanals an vererblicher Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie (s. Kapitel 1.2.3) konnte das Protein als (mit)verantwortlich für diesen Transportweg identifiziert werden (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002). Die Hintergründe des Ausstroms an der basolateralen Membran sind noch völlig unbekannt, vermutet wird ein $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Austausch (Flatman, 1991; Gunther, 1993; Dai et al., 2001). Es muss sich hierbei um einen aktiven Transport handeln, da das Magnesium entgegen ungünstiger Membranspannungsverhältnisse und Magnesiumgradienten in den interstitiellen Raum gelangt (Quamme, 1997; Quamme und de Rouffignac, 2000). In immuncytochemischen Versuchen wurde bereits ein Magnesium- und Calcium-sensitiver Rezeptor in der basolateralen Membran identifiziert (Yang et al., 1997; Riccardi et al., 1998). Es wird vermutet, dass noch ein zusätzlicher rezeptorgesteuerter Faktor eine Rolle in der Resorption von Magnesium spielt (Dai et al., 2001). Zusammen ergeben diese beiden Transportwege einen intermediären Verlauf (Kerstan und Quamme, 2002), der sich aus der Sättigungs-

kurve des aktiven, transzellulären Magnesiumtransports und der linearen Kurve des passiven, parazellulären Transportes zusammensetzt (Abb. 1.3). Während Letzterer durch das Gefälle der Magnesiumkonzentration und des Membranpotentials zwischen Lumen und Interstitium bestimmt wird, ist die Kapazität des aktiven Transportweges durch die Leistungsfähigkeit der beteiligten Ionenkanäle begrenzt (Konrad et al., 2004; Schlingmann und Gudermann, 2005; Schlingmann et al., 2007).

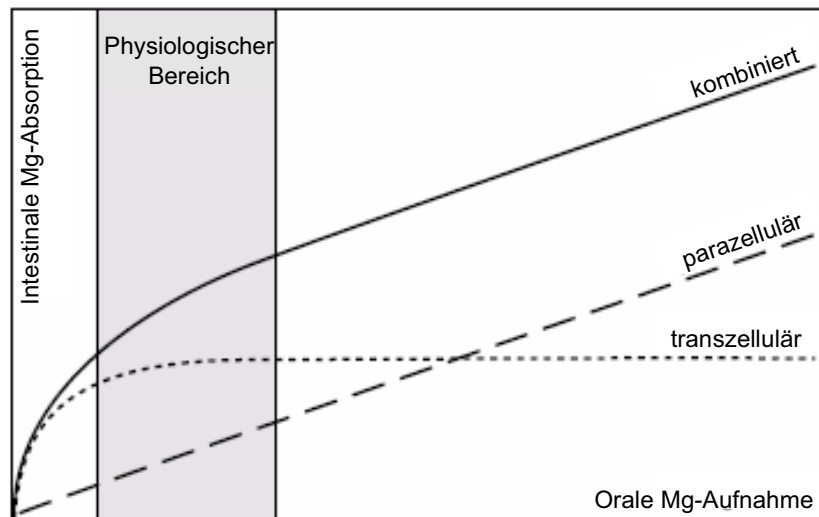


Abb. 1.3: Prinzip der intestinalen Magnesiumabsorption

Abhängigkeit der Magnesiumabsorption im Darm von der oralen Magnesiumaufnahme. Aktiver, transzellulärer Transport (gepunktete Linie, sättigbar) und passiver, parazellulärer Transport (gestrichelte Linie, konzentrationsabhängig) ergeben kombiniert einen intermediären Verlauf (durchgängige Linie).

(modifiziert nach Konrad et al., 2004)

Für den Menschen beträgt die täglich benötigte Magnesiummenge 4-10 mg/kg (Seelig, 1982; Geven et al., 1993). Die primäre Magnesiumabsorption geschieht hauptsächlich im Dünndarm (Jejunum und Ileum), der im Normalfall 30-50% des durch die Nahrung zugeführten Magnesiums aufnimmt, bei reduzierter oraler Magnesiumaufnahme können aber auch bis zu 70% absorbiert werden (Brannan et al., 1976). Hier besteht eine Kombination aus para- und transzellulärem Transport (Schlingmann und Gudermann, 2005; Schlingmann et al., 2007) (Abb. 1.4 A). Allerdings hat der transzelluläre Weg den größeren Anteil an der Magnesiumaufnahme, da aufgrund des relativ geringen Magnesiumanteils am gesamten Nahrungsbrei kein gravierendes Konzentrationsgefälle für Magnesiumionen zwischen Darmlumen und Interstitium besteht.

In der Niere wird der von den Glomeruli aus dem Blut abgefilterte Primärharn in die Nierentubuli geleitet. Hier findet eine Resorption der für den Körper benötigten Elektrolyte sowie eines Großteils des Wassers statt. Dabei wird ~80% des

Magnesiums aus dem Serum in den Glomeruli gefiltert und zu >95% in den Tubuli reabsorbiert (Cole und Quamme, 2000; Konrad et al., 2004), so dass der Urin eines gesunden Menschen am Ende nur noch 3-5% des gefilterten Magnesiums enthält (Satoh und Romero, 2002; Chubanov et al., 2005; Schlingmann et al., 2007). Bei einem extremen Magnesiumdefizit ist die Niere zudem in der Lage, das gefilterte Magnesium fast komplett zu resorbieren (Satoh und Romero, 2002).

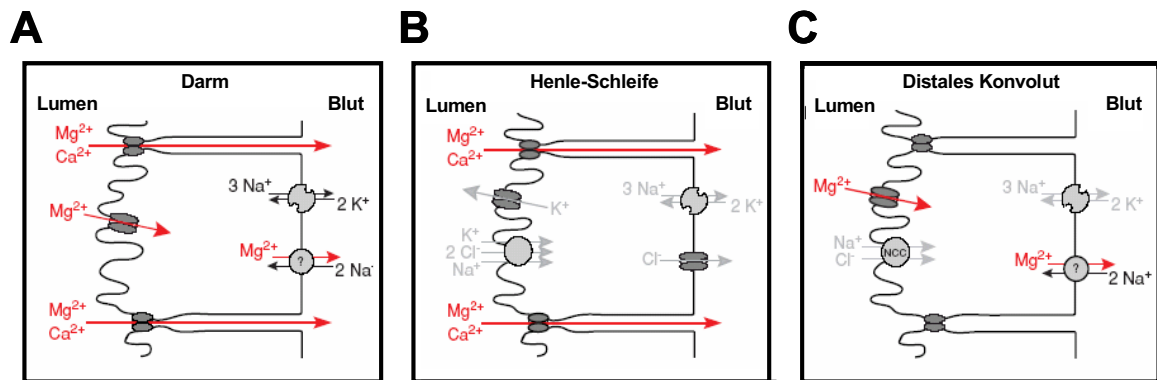


Abb.1.4: Mechanismen der Magnesiumaufnahme in Darm und Niere

A: Transzelluläre und parazelluläre Magnesiumabsorption im Darm mit einem putativen Magnesiumkanal an der lumenseitigen Membran und einem passiven Transport über die Zell-Zell-Verbindungen. An der basolateralen Membran sind Na^+/K^+ -Pumpen sowie Na^+/Mg^{2+} -Antiporter vorhanden; **B:** Parazelluläre Magnesiumresorption in der Henle-Schleife des Nephrons durch passiven Transport über die Zell-Zell-Verbindungen. An der lumenseitigen Membran befinden sich Kaliumkanäle sowie $Na^+/K^+/Cl^-$ -Symporter, an der basolateralen Membran Na^+/K^+ -Pumpen und Chloridkanäle; **C:** transzelluläre Magnesiumresorption im distalen Konvolut des Nephrons mit einem putativen Magnesiumkanal und Na^+/Cl^- -Kotransportern an der lumenseitigen Membran; an der basolateralen Membran sind Na^+/K^+ -Pumpen sowie Na^+/Mg^{2+} -Antiporter vorhanden. (modifiziert nach Schlingmann und Gudermann, 2005)

Der schematische Aufbau eines Nephrons und die durchschnittlich resorbierten Magnesiumanteile sind in Abb. 1.5 dargestellt. Im proximalen Konvolut wird mit 10-20% nur ein kleiner Anteil des gefilterten Magnesiums aufgenommen. Dies erfolgt auf dem parazellulären Weg und die Menge ist offensichtlich allein abhängig von der Magnesiumkonzentration im Lumen (Massry et al., 1967; Wong et al., 1979; Quamme, 1982). Der Hauptanteil an Magnesium mit etwa 60-70% wird in der Henle-Schleife resorbiert, der Großteil davon im kortikalen Abschnitt des dicken aufsteigenden Schenkels (Quamme, 1989; De Rouffignac et al., 1991; Mandon et al., 1993). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass auch hier die Magnesiumresorption auf passivem, parazellulärem Weg stattfindet (Shareghi und Agus, 1982; Quamme, 1989; Di Stefano et al., 1993) (Abb. 1.4 B).

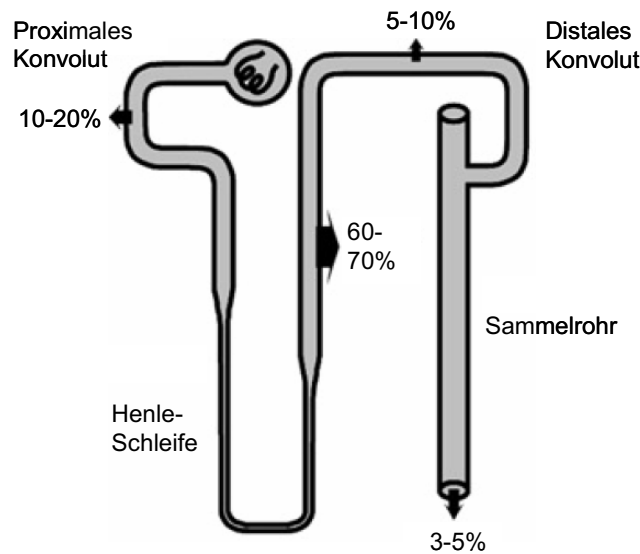


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Magnesiumresorption im Nephron

Angegeben ist die prozentuale Magnesium-Rückgewinnung aus dem Ultrafiltrat im proximalen Konvolut, in der Henle-Schleife, distalen Konvolut sowie der Magnesiumverlust mit dem Urin.

(modifiziert nach Satoh und Romero, 2002)

Im distalen Tubulus, der das distale Konvolut (oder früh-distaler Tubulus), den spät-distalen Tubulus und den Beginn des Sammelröhrchens beinhaltet (Velazquez et al., 1998), werden noch etwa 10-15% an Magnesium resorbiert (Quamme und de Rouffignac, 2000). Es gibt keine Hinweise, dass im spät-distalen Tubulus und im nachfolgenden Sammelrohr noch Magnesium resorbiert wird (Brunette et al., 1978; Bengèle et al., 1980; Wong et al., 1983), somit stellt die Resorption im früh-distalen Tubulus die letzte Möglichkeit zur Feineinstellung des Magnesiumhaushaltes dar. Hier findet erstmals in der Niere ein transzellulärer Transport statt, so dass unabhängig von Konzentrationsgefällen oder elektrochemischen Gradienten das für einen ausgeglichenen Magnesiumhaushalt benötigte Magnesium resorbiert werden kann (Quamme, 1989; Dai et al., 1997) (Abb 1.4 C).

Auf zellulärer Ebene beträgt die totale Magnesiumkonzentration in den meisten Säugetieren 14-20 mM, wobei das freie Magnesium in der Zelle sich auf 0,5-0,7 mM beschränkt (Flatman, 1984; Grubbs und Maguire, 1987; Romani und Scarpa, 1992; Romani, 2007). Das restliche, gebundene Magnesium befindet sich hauptsächlich im Nukleus, in den Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum (Somlyo et al., 1985; Dalal et al., 1998; Di Francesco et al., 1998). Diese zellulären Magnesiumkonzentrationen werden durch Regulation von MagnesiumEinstrom und -ausstrom sowie exakte Pufferung und Kompartimentierung von überflüssigem Magnesium

präzise eingehalten, wobei die genauen Hintergründe dieser Regulation noch nicht bekannt sind (Cole und Quamme, 2000). Es ist anzunehmen, dass diese exakten Konzentrationen nicht durch passive Fluxe zustande kommen können (Flatman, 1991; Takaya et al., 2000; Sgambato et al., 2001), sondern dass spezifische Mechanismen eine wichtige Rolle bei der zellulären Magnesiumhomöostase spielen (Romani und Scarpa, 2000). Für den Magnesiumefflux aus der Zelle wird ein Natrium-abhängiger und ein Natrium-unabhängiger Weg angenommen (Gunther et al., 1984). Für ersteren wurde ein $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Antiporter gefunden (Gunther und Vormann, 1985; Gunther, 1993), der Natrium-unabhängige Weg ist noch nicht aufgeklärt, es wird aber, je nach Versuchsbedingungen, ein Austausch von Magnesiumionen gegen extrazelluläre Manganionen (Feraý und Garay, 1987), Calciumionen (Romani et al., 1993; Cefaratti et al., 1998) oder Chloridionen (Gunther, 1993) vermutet. Für den Magnesiuminflux werden ebenfalls $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -Antiporter vermutet, zudem ein Mg^{2+} /Anionen-Kotransport (Gunther, 1993; Gunther und Hollriegel, 1993; Cefaratti et al., 1998), Transportwege, die den elektrochemischen Gradienten von Natriumionen und anderen Kationen nutzen (Paolisso et al., 1990; Cefaratti et al., 1998). Nicht zuletzt ist auch eine große Anzahl von Kanälen beteiligt (Schlingmann und Gudermann, 2005; Romani, 2007), unter anderem TRPM7 und in bestimmten Geweben auch TRPM6 (Walder et al., 2002; Chubanov et al., 2004; He et al., 2005; Gwanyanya et al., 2006; Touyz et al., 2006).

1.2.2 Ausprägung der HSH

Die autosomal rezessiv vererbte Krankheit Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie (HSH, OMIM 602014) wurde erstmals im Jahre 1968 von Paunier et al. beschrieben (Paunier et al., 1968). Sie manifestiert sich bereits im Säuglingsalter und ist gekennzeichnet durch sehr geringe Magnesium- und Calciumkonzentrationen im Blut und einer damit einhergehenden extremen Exkretion von Magnesium und Calcium im Urin. Während der normale Serumgehalt im Menschen $\geq 0,65$ mmol/l Magnesium und $\geq 2,1$ mmol/l Calcium beträgt, wird bei Konzentrationen darunter von einer Mangelerscheinung gesprochen. Es sind HSH-Patienten bekannt, bei denen die Magnesium- und Calciumkonzentration nur noch 0,04 mmol/l bzw. 0,93 mmol/l betrug (Shalev et al., 1998). Dieser Mangel führt zu Krampfanfällen und neurologischen Störungen. Die Erkrankung ist zur Zeit nicht heilbar, sie ist aber durch eine lebenslange orale, hochdosierte Magnesiumgabe leicht zu behandeln, da

hierdurch eine ausreichende Magnesiumaufnahme gewährleistet werden kann. Dabei werden teilweise Dosen verabreicht, die dem 16-fachen des normalen Tagesbedarfs entsprechen (Cole und Quamme, 2000). Die Magnesiumkonzentration im Serum erreicht dadurch Werte, die zwar teils suboptimal, aber ausreichend für eine normale Körperfunktion sind. Unbehandelt kann HSH zu dauerhaften neurologischen Schädigungen oder sogar zum Tode führen, weil wichtige Körperfunktionen nicht mehr aufrechterhalten werden können (Shalev et al., 1998; Schlingmann und Gudermann, 2005; Schmitz et al., 2007). Die eigentliche Gefahr der Krankheit besteht somit darin, dass die Ursache für die beobachteten Symptome zu spät erkannt wird und zum Zeitpunkt der Therapie schon eine dauerhafte Schädigung des Körpers besteht (Jalkanen et al., 2006).

Während als Ursache für den Magnesiummangel zuerst nur die verminderte Absorption von Magnesium im Dünndarm angesehen wurde (Nordio et al., 1971; Lombeck et al., 1975; Milla et al., 1979), fand man später, dass auch eine gestörte Magnesiumresorption in der Niere eine Rolle spielt, da HSH-Patienten nach Magnesiuminfusionen deutlich mehr Magnesium mit dem Urin abgaben als gesunde Vergleichspersonen (Walder et al., 2002). Der Calciummangel, der das Krankheitsbild mitprägt, ist sekundär verursacht. Verantwortlich ist ein Funktionsverlust der Nebenschilddrüse, deren Produkt, das Parathormon, normalerweise für die Resorption von Calcium im distalen Nephron sorgt (Anast et al., 1972). Bei starkem Magnesiummangel wird die Sekretion des Parathormons aus der Nebenschilddrüse gehemmt, so dass es nachfolgend zum Calciummangel kommt (Vetter und Lohse, 2002). Zudem scheint das Zielorgan, die Niere, durch die Hypomagnesiämie unempfindlich gegenüber dem Parathormon zu werden (Michelis et al., 1975; Rude et al., 1976), weswegen es ebenfalls zu keiner Resorption von Calcium im distalen Tubulus mehr kommt. Da somit auch supplementiertes Calcium nicht mehr resorbiert wird, kann der Calciummangel nicht durch eine orale Calciumgabe ausgeglichen werden. Erst ein Ausgleich des Magnesiumhaushalts durch die diätetische Zufuhr von Magnesium kann auch indirekt den Calciumspiegel im Blut auf ein annähernd normales Niveau bringen (Schlingmann et al., 2002; Schlingmann et al., 2007).

1.2.3 TRPM6- und TRPM7-Proteine in Magnesiumhomöostase und HSH

Es wurde schon früh vermutet, dass auch Kanäle für den Magnesium- und Calciumtransport verantwortlich und somit an deren Homöostase beteiligt sein

könnten (Dai et al., 1997; Quamme, 1997; Walder et al., 1997). Einen eindeutigen Nachweis erbrachte man jedoch erst, nachdem bei Krankheiten oder Mangelerscheinungen, die den Magnesium- und auch Calciumhaushalt betrafen, Mutationen in verschiedenen Kanälen, unter anderem TRP-Kanälen, gefunden wurden (Kimberling et al., 1988; Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002; Hoenderop et al., 2003a; Reiser et al., 2005), übersichtlich zusammengefasst von Hsu et al. (Hsu et al., 2007).

Die Rolle des TRPM6-Kanals in der HSH wurde deutlich, nachdem von zwei Arbeitsgruppen zeitgleich im für die Krankheit verantwortlichen Genlokus (9q22, später zu 9q21.13 korrigiert) Transkripte des TRPM6-Proteins gewonnen werden konnten (Walder et al., 1997; Walder et al., 2002). Sie postulierten eine Beteiligung des TRPM6 an der Magnesiumaufnahme im Körper, nachdem bei Patienten mit HSH im entsprechenden Gen Mutationen gefunden wurden. (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002). Für eine Beteiligung des TRPM6-Kanals spricht auch sein eingeschränktes Expressionmuster im menschlichen Körper (s. Kapitel 1.1.2.2). Die subzelluläre Bestimmung der Expression ergab, dass das TRPM6-Protein hauptsächlich in den lumenseitigen Membranen zu finden sind, d.h. im Bürstensaum des Dünndarms und der apikalen Membran der Zellen des distalen Konvoluts der Niere (Voets et al., 2004b). Das entspricht den Orten, an denen die aktive Magnesiumaufnahme stattfindet. Außerdem weist der TRPM6-Kanal als einer von wenigen Kanälen eine hohe Permeabilität für Magnesium auf (Voets et al., 2004b). Für die Beteiligung des TRPM6-Kanals an der Magnesiumhomöostase ergibt sich dadurch folgendes Bild: Er scheint das verantwortliche Protein für die apikale Aufnahme von Magnesium in die Epithelien sowohl des Dünndarms als auch des distalen Konvoluts im Nephron zu sein und nimmt hier offensichtlich eine zentrale Stellung ein, da durch Mutationen im TRPM6-Gen der gesamte Magnesiumhaushalt eines Organismus empfindlich gestört wird. Da die Funktionalität des TRPM6-Proteins bei HSH-Patienten nicht mehr gegeben ist, kann im Darm statt über den trans- und parazellulären Weg (Abb 1.6 A) nur noch über den parazellulären, passiven Weg Magnesium aus der Nahrung gewonnen werden (Abb 1.6 B). Da zudem auch der aktive Transport im distalen Tubulus unterbunden ist, stellt die passive Magnesiumresorption in der Henle-Schleife des Nephrons die einzige weitere Möglichkeit der Magnesiumgewinnung dar.

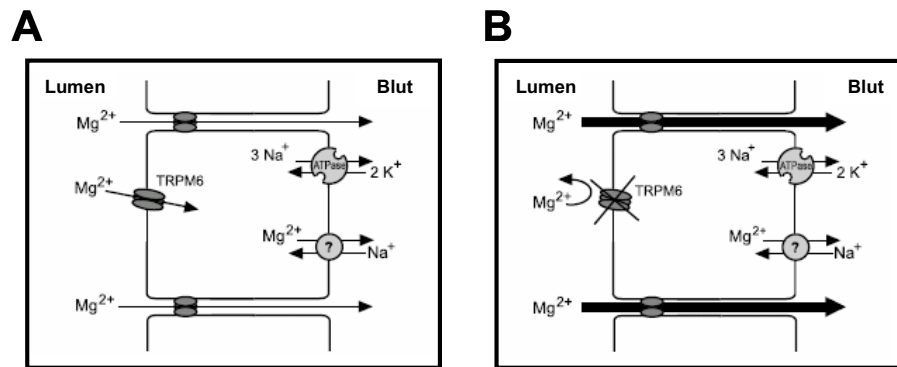


Abb.1.6: Mechanismen der Magnesiumaufnahme im Darm eines gesunden Menschen und eines Menschen mit HSH

A: Transzelluläre und parazelluläre Magnesiumabsorption im Darm durch den TRPM6-Kanal an der lumenseitigen Membran und einen passiven Transport über die Zell-Zell-Verbindungen; **B:** Verstärkte parazelluläre Magnesiumabsorption im Darm nach hochdosierter, oraler Magnesiumgabe bei Menschen mit HSH, der transzelluläre Weg durch TRPM6-Kanäle ist verhindert.

In beiden Abbildungen befinden sich an der basolateralen Membran Na⁺/K⁺-Pumpen sowie Na⁺/Mg²⁺-Antiporter.

(modifiziert nach Konrad et al., 2004)

In den meisten Fällen, in denen es zu einer Ausprägung der HSH kommt, verhindern die Mutationen im TRPM6-Gen eine Lokalisation des Proteins an der Zelloberfläche, so dass TRPM6-Kanaluntereinheiten nicht mehr für die Bildung von funktionellen Kanälen zur Verfügung stehen. Die bisher bekannten Mutationen resultierten in verfrühten Stopcodons, Verschiebungen des Leserasters mit der gleichen Konsequenz, oder alternativem Spleißen. Jede davon verhindert die Generierung eines funktionsfähigen Proteins (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002). Zudem ist eine Punktmutation, S141L, bekannt, bei der das mutierte Proteine komplett translatiert wird, aber aufgrund einer gestörten Multimerisierung nicht mehr an die Oberfläche transportiert wird (Chubanov et al., 2004).

Während die Beteiligung des TRPM6-Kanals an der Magnesiumaufnahme in Epithelien gezeigt wurde, kann die Rolle des TRPM7-Kanals noch nicht genau bestimmt werden. Aufgrund seiner ubiquitären Expression kann er prinzipiell als Heteromultimerisierungspartner von TRPM6-Proteinen zur Verfügung stehen, zudem wurde gezeigt, dass TRPM6-Kanaluntereinheiten alleine nicht in der Lage ist, an die Zellmembran zu gelangen oder funktionelle Kanäle zu bilden. Dies gelingt erst durch Koexpression von TRPM7-Protein (Chubanov et al., 2004; Schmitz et al., 2005). Demgegenüber steht eine wachsende Anzahl an Studien, die funktionelle Daten von homomeren TRPM6-Kanälen zeigen (Voets et al., 2004b; Li et al., 2006; Li et al.,

2007; Topala et al., 2007), was eine Einschätzung der Situation erschwert. Bedacht werden muss in jedem Fall, dass all diese Daten in heterologen Expressionssystemen gewonnen wurden und somit nicht notwendigerweise den Verhältnissen *in vivo* entsprechen müssen (Schmitz et al., 2007). Tatsache ist, dass der TRPM7-Kanal nicht in der Lage ist, die Aufgabe des TRPM6 zu übernehmen, da es in HSH-Patienten trotz intakter TRPM7-Allele zur Ausprägung der Krankheit kommt. Das bedeutet, dass es Unterschiede in den Aufgaben der beiden Kanäle im Organismus geben muss.

TRPM7-Kanäle scheinen außerdem auch unabhängig vom TRPM6 eine wichtige Rolle bei der zellulären Magnesiumhomöostase zu spielen, da gezeigt werden konnte, dass das beobachtete Absterben von TRPM7-defiziente DT-40-Zellen durch die Gabe von hoch dosiertem, extrazellulärem Magnesium verhindert werden konnte (Schmitz et al., 2003). Da das TRPM7-Protein in fast allen Zelltypen exprimiert wird, ist es möglich, dass dieser Kanal verantwortlich für die Aufnahme von Magnesium in die Körperzellen ist. In kürzlich erschienenen Arbeiten wurde gezeigt, dass er an der Magnesiumaufnahme in vaskulären glatten Muskelzellen (Touyz et al., 2006) und in Erythrozyten beteiligt sein könnte (Gunther, 2007).

1.2.3.1 Patient mit Aminosäureaustausch P1017R im TRPM6-Protein

Der Patient, bei dem die im Folgenden beschriebene Mutation gefunden wurde, litt im Alter von sieben Monaten unter den typischen Symptomen der HSH wie Diarrhöe und Krampfanfällen. Es wurden Serumlevel von 0,29 mM Magnesium und 1,6 mM Calcium festgestellt (im Vergleich zu normalen Konzentrationen von 0,7-1,1 mM Mg^{2+} und 2,2-2,9 mM Ca^{2+}). Die Symptome verschwanden nach oraler Gabe von 0,63 mmol/kg Magnesium pro Tag und der Magnesiumlevel im Blut erholte sich auf 0,50 mM (Schlingmann et al., 2005). Bei genetischen Analysen des TRPM6-Gens dieses Patienten, das zu diesem Zeitpunkt bereits als in der HSH involviert bekannt war (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002), wurde zunächst eine Spleiß-Mutation, die das Exon 11 betraf, gefunden. Es handelt sich dabei um die Deletion, die zu einer Verschiebung des Leserasters und daraus resultierend zum vorzeitigen Translationsabbruch führt und somit kein vollständiges Protein mehr entstehen lässt. Daneben wurde aber bei weiteren Untersuchungen auch ein Basenaustausch von Cytosin-3050 zu Guanin festgestellt, die zu einem nicht-konservativen Aminosäureaustausch von Prolin zu Arginin an der Position 1017 führte und somit in einem vollständigen Protein resultiert.

Weitere genetische Analysen in der Familie zeigten, dass die Mutter ein mutiertes TRPM6-Allel mit der Spleiß-Mutation besaß, beim Vater fand sich ein mutiertes Allel mit dem Aminosäureaustausch P1017R. Beide besaßen jedoch noch ein gesundes Allel, das genügend TRPM6-Protein bilden konnte, so dass die Krankheit nicht zum Ausbruch kam. Der Patient hatte jeweils die unterschiedlich mutierten Allele von jedem Elternteil bekommen und aufgrund dieses Zustandes die HSH entwickelt.

1.3 Zielsetzung

Die Bedeutung des TRPM7-Kanals für die zelluläre Magnesiumhomöostase wurde bereits gezeigt. Seit der Identifizierung verschiedener Mutationen im TRPM6-Gen bei Patienten mit Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie (HSH) wurde auch die Rolle dieses Kanals bei der Absorption und Resorption von Magnesium im Darm bzw. in der Niere deutlich. In dieser Arbeit wurde eine neue, in einem HSH-Patienten gefundene Mutation in der putativen porenbildenden Region des TRPM6-Proteins auf ihre Auswirkungen bezüglich der Aktivität des TRPM6/TRPM7-Kanalkomplexes untersucht.

In der so identifizierten Porenregion wurden gezielte Mutationen im TRPM7 sowie in anderen TRPM-Kanälen generiert und nachfolgend mittels *patch clamp*-Messungen funktionell analysiert. Dadurch sollte Aufschluss über die molekularen Hintergründe der hohen Diversität der Permeationseigenschaften innerhalb der TRPM-Subfamilie gewonnen werden. Dabei wurde in phylogenetischen Analysen ein Augenmerk auf die strukturellen Veränderungen während der Evolution von TRPM-Kanälen und ihre möglichen Auswirkungen auf die Kanaleigenschaften gerichtet.

Das so gewonnene Verständnis über die molekularen und evolutionären Hintergründe der Kanaleigenschaften kann helfen, die physiologischen Rollen der Mitglieder dieser Subfamilie in Zukunft eindeutiger zuzuordnen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Die Materialien für die zellphysiologischen Arbeiten stammten von der Firma Sarstedt, Salze und andere Verbrauchskemikalien wurden von den Firmen Sigma, Fluka und Roth bezogen. Ausnahmen werden gesondert erwähnt.

Alle Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) aus einer Optipure Analytical-Anlage (MembraPur GmbH) hergestellt. Der pH-Wert wurde mittels NaOH, CsOH oder HCl mithilfe eines pH-Meters (Level1, InoLab) eingestellt und die Osmolarität in einem Dampfdruckpunkt-Osmometer (Vapro 5520, Wescor Inc.) bestimmt, wobei die Lösungen 290-310 mOsm/kg enthalten sollten.

2.2 Zellphysiologische Arbeiten

2.2.1 Zellkultur

In den beschriebenen Versuchen wurde die HEK293- (*human embryonic kidney*) Zelllinie sowie aus HEK293-Zellen generierte, die gewünschten Kanäle stabil exprimierende Zelllinien (s. Kapitel 2.2.1.2) benutzt.

Alle Zellen wurden in 250 ml Kulturflaschen (Sarstedt) bei 5% CO₂ und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Zudem enthielten alle Nährmedien grundsätzlich 10% fötales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS, Gibco) als Lieferant für die nötigen Wachstumsfaktoren sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories), um bakteriellen Verunreinigungen entgegenzuwirken.

2.2.1.1 *Human embryonic kidney* (HEK) Zelllinie

Als heterologes Expressionssystem wurden HEK293-Zellen gewählt. Diese Zelllinie wurde ursprünglich aus humanem embryonalem Nierengewebe etabliert und wächst einzellschichtig.

Die HEK293-Zellen wurden in *Earle's minimal essential medium* (Earle's MEM, PAA Laboratories) kultiviert. Dazu wurden die Zellen aus etwa vier Tage alten Kulturflaschen nach einmaligem Waschen mit *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS, PAA) durch kurze Inkubation mit Trypsin-EDTA (PAA) abgelöst und 500000 bis 1 Mio. Zellen in eine neue Flasche mit frischem Medium überführt.

2.2.1.2 Stabil exprimierende Zelllinien

Für verschiedene Messungen, insbesondere, wenn zwei unterschiedliche Kanalproteine gleichzeitig exprimiert werden sollten, wurden Zelllinien verwendet, die die cDNA-Sequenz für das TRPM6- oder TRPM7-Protein unter der Kontrolle des Promotors für einen Ecdyson-Rezeptor stabil im Genom integriert hatten und diese Proteine nach Induktion durch Ponasteron A exprimierten (im weiteren TRPM6^{pIND} und TRPM7^{pIND} genannt). Dieses induzierbare Expressionssystem war notwendig, da die dauerhafte Überexpression des TRPM7-Proteins zum Absterben der Zellen führt (Nadler et al., 2001; Schmitz et al., 2003).

Das Expressionssystem besteht aus zwei Komponenten, der auf HEK293-Zellen basierenden Zelllinie EcR293, sowie einem Plasmid, das das gewünschte Gen unter der Kontrolle eines für diesen Rezeptor spezifischen Promotors enthält. Die Zelllinie exprimiert stabil zwei Rezeptoren, einen modifizierten Ecdysonrezeptor (VgEcR) und den Retinoid X Rezeptor (RXR), die zunächst keine Funktion besitzen. Erst nach der Induktion durch das Hormon Ecdyson oder sein Analogon Ponasteron A heterodimerisieren sie zu einem funktionellen Rezeptor, der dann in der Lage ist, als Transkriptionsfaktor den entsprechenden Promotor zu besetzen. Dadurch veranlasst das Rezeptordimer die Transkription des nachfolgenden Gens und somit die Expression des entsprechenden Proteins. Außerdem besitzt die Zelllinie zusammen mit der Sequenz für die Rezeptoren eine Antibiotikaresistenz, die es ermöglicht, durch Selektionierung mit Zeozin die Rezeptor-cDNA stabil in den Zellen zu halten. Diese Zelllinie wird mit dem pIND (SP1)/Hygro-Vektor transfiziert, auf dem ein durch den Ecdyson-Rezeptor aktivierbarer Promotor liegt. Hinter diesem Promotor befinden sich Restriktionsschnittstellen, in die zuvor ein Plasmidvektor mit der gewünschten cDNA (in diesem Fall TRPM6 oder TRPM7) subkloniert wurde. Zusätzlich enthält das Plasmid eine Hygromycin B-Resistenz als Selektionsmarker.

Nach dem Einbringen des pIND-Vektors in die EcR293-Zelllinie wurde zunächst mit 400 µg/ml Hygromycin (Invitrogen) auf dauerhaft transfizierte Zellen selektioniert, die das Plasmid stabil ins Genom eingebaut hatten. Anschließend wurden monoklonale Zelllinien gewonnen (Klon 2-1 für TRPM6^{pIND}, Klon 2-19 für TRPM7^{pIND}).

Durch Applikation von Ponasteron A (Invitrogen) konnte dann die Synthese des jeweils enthaltenen Kanals in den Zellen induziert werden. Bei Bedarf wurde noch zusätzlich ein zweiter Kanal transient exprimiert.

Die stabilen Zelllinien wurden in *Dulbecco's modified essential medium* (D-MEM, PAA Laboratories) kultiviert, wobei in diesem Fall nach der Trypsinierung 1/2 bis 1/5 der Zellsuspension in eine neue Flasche überführt wurde. Für die Kultur der EcR-Zelllinie wurde dem Medium 200 µg/ml Zeozin (Invitrogen) hinzugefügt, für die TRPM6^{pIND}- und TRPM7^{pIND}-Zelllinien zusätzlich 400 µg/ml Hygromycin B (Sigma), um die jeweils ins Genom inserierten Plasmidvektoren in den Zellen zu halten.

2.2.1.3 Induktion stabiler Zelllinien

Um die Zelllinien zur Expression des ins Genom eingebauten Kanalproteins zu bringen, wurde mit 0,1 - 5 µM Ponasteron A (gelöst in 100%igem Ethanol) versetztes Medium auf die Zellen gegeben und inkubiert, bis die Zellen zur Messung umgesetzt wurden. Die Messungen erfolgten, entsprechend der Angaben der Literatur (Nadler et al., 2001; Hofmann et al., 2002), 16-24 Stunden nach Induktionsbeginn. Wenn eine zusätzliche transiente Expression nötig war, wurden die Zellen zuerst transfiziert und frühestens zehn Stunden später induziert. Bei Vergleichen zwischen induzierten und nicht induzierten Zellen wurde als Negativkontrolle bei den nicht zu induzierenden Zellen statt des Ponasterons lediglich 0,1 - 5 µl 100%-iges Ethanol in das Medium gegeben. So konnten artifizielle Effekte durch das Lösungsmittel ausgeschlossen bzw. minimiert werden.

2.2.2 Transfektionen

Zur Transfektion nach dem Prinzip der Lipofektion wurden in 35 mm Schälchen (Nunc) oder Sechs-Loch-Schalen (Sarstedt) (für Elektrophysiologie bzw. Calciummessungen) ausgesäte Zellen verwendet, die in ca. 48 Stunden zu einer Konfluenz von 70-80% herangewachsen waren.

Das Transfektionsmittel (TransIT (Mirus Bio Corporation) oder Eugene6 (Roche Molecular Biosciences) wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Transfiziert wurden 1-2 µg Plasmid-DNA, die Messungen erfolgten nach sechs bis 48 Stunden. Dazu wurde das transfizierte Schälchen kurz trypsinisiert und auf 6-8, teilweise mit Polylysin (Sigma) beschichtete Schälchen verteilt.

2.2.2.1 Klone

Die cDNAs der zu transfizierenden Kanäle wurde in den pIRES2- oder pcDNA3.1-Vektor kloniert, letzterer kodierte teilweise für Fusionsproteine, bei denen N-terminal ein eGFP, eYFP- oder myc-Protein kovalent an das Kanalprotein gebunden war. Die

Klonierung des humanen TRPM2 (NM_003307), TRPM6 (Variante A, AY333285) und TRPM8 (NM_076985) sowie des murinen TRPM7 (NM_021450) in den pcDNA3.1/V5-His TA-TOPO erfolgte wie bereits in früheren Untersuchungen beschrieben (Chubarov et al., 2004). Dieselbe Vorgehensweise galt auch für die Klonierung in den pIRES-eGFP2-Vektor (Clontech). Aminosäureaustausche wurden über zielgerichtete Mutagenesen generiert (s. Kapitel 2.3.2). Ein Großteil der Klone wurde von Dr. Vladimir Chubarov freundlicherweise zur Verfügung gestellt, der Maus-TRPM8 im pcDNA3.1 TOPO-Vektor wurde von Carsten Strübing überlassen.

2.2.3 Konfokale Mikroskopie

Zum Nachweis der Oberflächenexpression verschiedener Mutanten und/oder Kanalproteinkomplexe wurden HEK293-Zellen auf 25 mm-Glasplättchen ausgesät und wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben transfiziert, in diesem Fall stets mit den cDNAs für eYFP- oder eGFP-fusionierte Kanalproteine. Teilweise fand eine Koexpression von Fluoreszenzfarbstoff-fusioniertem und nicht fusioniertem Protein statt, wobei ein Verhältnis von 1:3 zwischen kovalent eYFP/eGFP-gebundenen und nicht gebundenen cDNAs eingehalten wurde. Nach 16-24 h wurden diese Glasplättchen mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM510 META, Carl Zeiss) mit einem Argonlaser (Excitations-Wellenlänge 488 nm) analysiert und dokumentiert. Dabei wurde ein 63x/1.4 Plan-Apochromat Öl-Objektiv sowie ein 505 nm Tiefpass-Filter verwendet. Es wurden konfokale und Differential-Interferenzkontrast (DIC) –Bilder aufgenommen, die einzeln und in Überlagerung dargestellt wurden, was eine genaue Lokalisation der Proteine in der Zelle ermöglichte.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

2.3.1.1 Chemisch kompetente Zellen und Transformation

Für die Transformationen wurden selbst hergestellte, chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*)-Zellen vom Stamm DH5 α verwendet und zunächst auf Eis aufgetaut. Dann wurde 50 bis 200 ng Plasmid–DNA zu den Zellen gegeben und für 30 min stehen gelassen. Danach folgte die Transformation für 30 s bei 42°C. Zur

Regeneration wurden die Zellen erneut für 2 min auf Eis gestellt und anschließend 200–500 µl warmes Luria Bertani (LB)-Medium hinzugegeben. Nach weiteren 30-60 min bei 37°C wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin (Sigma; für z.B. pcDNA 3.1-Vektor) oder 50 µg/ml Kanamycin (Sigma; für pIRES2-Vektor) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

Am nächsten Tag wurden einzelne Klone von der Platte gepickt und in Erlenmeyerkolben mit 2 ml, 20 ml oder 200 ml LB-Medium angeimpft und zur Präparation der Plasmid-DNA über Nacht bei 37°C herangezogen.

2.3.1.2 Plasmid-Präparation im kleinen Maßstab

Zur Überprüfung des Erfolgs einer Mutagenese wurde zunächst lediglich eine Präparation geringer Mengen an Bakteriensuspension durchgeführt. Dabei wurde für einen Kontrollverdau 2 ml Bakteriensuspension aufgearbeitet, für Sequenzierungen 20 ml.

Verwendet wurde der PeqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (Peqlab Biotechnology GmbH) nach Angaben des Herstellers. Das DNA-Pellet wurde in 30-50 µl steril filtriertem H₂O aufgenommen und für nachfolgende Sequenzierungen wurde Konzentration sowie Reinheit der DNA mit einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt.

2.3.1.3 Plasmid-Präparation im mittleren Maßstab

Die Gewinnung größerer Mengen von Plasmid-DNA für Transfektionen erfolgte mit dem NucleobondAX-Kit von Macherey-Nagel mit der entsprechenden Anleitung. Hierzu wurden die Zellen in 200 ml LB-Medium herangezogen.

Das DNA-Pellet wurde in 50-100 µl steril filtriertem H₂O aufgenommen und DNA-Konzentration und Reinheit bestimmt.

2.3.2 Zielgerichtete Mutagenesen

Für die zielgerichteten Mutagenesen mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde der QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) benutzt.

Der PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

10 ng	Template-Plasmid
je 200 µM	5'- und 3'-Primer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer)
1 µM	je dNTP

1x	PCR-Puffer
1,5 µl	QuikSolution
1,5 U	Pfu-Polymerase

Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 25 µl aufgefüllt und die PCR mit folgendem Programm in einem auf 95°C vorgeheizten T 3 Thermocycler (Biometra) durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	95°C; 1 min	
Denaturierung:	95°C; 50 s	} 18 Wiederholungen
Anlagerung:	60-75°C; 50 s	
Verlängerung:	68°C; 1 min/kb (10-12 min)	
Finale Verlängerung:	68°C; 7 min	

Nach Ablauf der PCR wurde 1 µl (10 U) des Restriktionsenzym DpnI (Fermentas) zum Ansatz gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert, um die nicht mutierte und deswegen noch methylierte DNA-Vorlage zu verdauen, so dass am Ende nur die neu synthetisierte DNA im Ansatz verblieb.

Das PCR-Produkt wurde anschließend in *E. coli*-Bakterien des Stammes DH5α transformiert, auf LB-Agarplatten ausgestrichen und einzelne Klone in LB-Medium angezüchtet, jeweils mithilfe des entsprechenden Antibiotikums als Selektionsmittel. Dann wurde eine Plasmid-Präparation (s. Kapitel 2.3.1) durchgeführt und der Erfolg der Mutagenese durch Sequenzierung (SeqLab, MWG) überprüft.

2.3.2.1 Oligonukleotide zur Mutagenese

Sämtliche Oligonukleotide wurden mithilfe eines Programms auf der Internetseite des QuikChange-Kits von Stratagene: (<http://www.stratagene.com/sdmdesigner/default.aspx>) generiert und bei der Firma MWG hergestellt.

Eine Liste der verwendeten Mutageneseoligonukleotide befindet sich im Anhang (s. Kapitel 7)

Lösungen:

LB-Medium:

1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Pepton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt; pH7,0 mit NaOH

LB-Agar:

LB-Medium + 2% (w/v) Bacto-Agar (Beckton, Dickinson & Co.); pH 7,0 mit NaOH

Beide Medien wurden anschließend autoklaviert.

2.3.3 DNA-Analyse

2.3.3.1 Enzymatische Restriktion

Je nach Plasmid wurden die entsprechenden Restriktionsenzyme bestimmt, die eine einwandfreie Analyse der entstandenen Fragmente gewährleisten.

Danach wurde folgender Ansatz zusammengestellt und bei 37°C für 2-3 h verdaut:

1 µg	Plasmid-DNA
1x	Puffer
5 U	je Restriktionsenzym
ad 10 µl mit ddH ₂ O	

2.3.3.2 Auftrennung der DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese

Die geschnittene Plasmid-DNA wurde mit Ladepuffer (Loading Dye, Fermentas) gemischt und in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße wurde zusätzlich eine Tasche des Gels mit einem passenden Marker (z.B. 1kb-Marker, Fermentas) bestückt.

Anschließend wurde eine Elektrophorese bei 100 mV für 60-90 min durchgeführt und das Gel anschließend auf einem UV-Tisch analysiert.

TAE (Tris/Acetat/EDTA-Puffer):

2 M Tris-Puffer; 1 M Essigsäure; 0,1 M EDTA (pH 8,3 mit konzentrierter Essigsäure)

Agarosegel:

1% peqGOLD-Agarose (peqlab) in 1x TAE-Puffer

2.4 Funktionale Untersuchungen

2.4.1 Elektrophysiologische Messungen mittels *patch clamp*-Technik

Die *patch clamp*-Technik (Hamill et al., 1981) bietet die Möglichkeit, Ionenströme durch Membrankanäle auf zellulärer Ebene zu messen. Dabei wird eine über eine Silber/Silberchlorid-Elektrode geschobene, lösungsgefüllte Glaspipette mit einem möglichst hohem Abdichtwiderstand an die zu messende Zelle gebracht. Anschließend wird, zumindest in der Ganzzelleableitung, die Fläche unter der Pipette aufgerissen, um einen Kontakt zwischen Pipettenlösung und Zellinnerem herzustellen und somit eine elektrische Verbindung zu erreichen. Dann wird (in der hier

angewendeten Spannungsklemme) eine feste Spannung oder eine Spannungsrampe als Sollspannung an die Zelle angelegt, indem eine Potentialdifferenz zwischen einer in der Pipette befindlichen Elektrode und einer Referenzelektrode in der Badlösung erzeugt wird. Die Zelle „antwortet“ mit einem Strom, um die angelegte Sollspannung aufrecht zu erhalten. Über die die Zelle umgebende Lösung und eine in dieser Lösung befindliche Referenzelektrode ergibt sich ein geschlossener Stromkreis, der es ermöglicht, mittels entsprechend sensibler Aufnahmegeräte die durch die Zellmembran und somit Kanäle fließenden Ströme aufzuzeichnen. Dabei ergibt sich für jeden Kanal eine typische Stromantwort bei den verschiedenen angelegten Spannungen oder Spannungsrampen. So lassen sich endogene Kanäle messen oder, durch eine zusätzliche Expression bestimmter Kanäle, die biophysikalischen Eigenschaften dieser Kanäle in Ganzzellkonfigurationen exakt bestimmen.

2.4.1.1 Messtand

Für die Messungen wurde ein EPC10 *patch clamp*-Verstärker (HEKA) verwendet. Mittels eines Mikromanipulators (Luigs & Neumann), auf dem der Vorverstärker angebracht war, konnte die Messpipette manövriert werden. Die verwendete, für Nunc-Schälchen konstruierte Messkammer (Eigenbau) wurde auf einem inversen Mikroskop (IX70, Olympus) platziert. Sie ermöglichte einen steten Flüssigkeitsaustausch über den Zellen und somit die Applikation verschiedener Badlösungen, die im Nunc-Schälchen von einer Peristaltik-Pumpe (Eigenbau) abgesaugt wurden. Die Lösungen wurden durch Silikon- und Tygon-Schläuche zur Messkammer geleitet und bei Bedarf über Y-Stücke verbunden. Der Messaufbau wurde durch einen Faraday-Käfig von Störungen durch das Netzbrummen abgeschirmt, zusätzlich wurden alle Bauteile geerdet. Als Fluoreszenzquelle wurde das Modell X-Cite (Series 120) der Firma EXFO mit einer Mischgas-Lampe verwendet. Als Messelektrode diente ein chlorierter Silberdraht, der bei Bedarf in 3 M Kaliumchloridlösung neu chloriert wurde. Die Badelektroden stammten von der Firma World Precision Instruments und bestanden ebenfalls aus Silber und Silberchlorid.

2.4.1.2 Pipettenherstellung

Mittels eines Pipettenziehgerätes (DMZ-Universal Puller, Zeitz) wurden aus Borosilikatröhrchen (Science Products, Hofheim) in drei Schritten Messpipetten mit dem benötigten Widerstand gezogen und in einem weiteren Schritt poliert. Danach

wurden die Pipettenspitzen dünn mit einem Polymer (R-6101) bestrichen das mithilfe eines Heizdrahtes ausgehärtet wurde. Bei den verwendeten Lösungen erreichten die Pipettenwiderstände nicht mehr als 3,3 M Ω , im Durchschnitt betrugen sie 1,7-2,5 M Ω .

2.4.1.3 Ganzzellaufleitungen

Es wurden nur Fluoreszenz-positive Zellen gemessen, abgesehen von Versuchen mit den induzierten Zelllinien, bei denen anzunehmen war, dass alle Zellen den gewünschten Kanal exprimieren. Die Messungen wurden in der konventionellen Ganzzellkonfiguration bei Raumtemperatur durchgeführt. Appliziert wurden Aufwärtsschritte von -100 mV bis +100 mV mit einer Steigung von 0,5 mV/ms und einer Frequenz von ca. 2 Hertz. Die Schritte beinhalteten zu Beginn und zum Ende eine Plateauphase von 50 ms, um die Bestimmung eines Mittelwertes der Stromantwort bei diesen Spannungen (-100 mV und +100 mV) zu ermöglichen. Die Daten wurde mit einer Frequenz von 5 kHz aufgezeichnet und anschließend mit 1,67 kHz gefiltert. Der Zugriffs- oder Serienwiderstand wurde zu 80% durch die Pulse-Software korrigiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Zugriffswiderstände nach der Korrektur nicht mehr als 10 M Ω betrugen, andernfalls wurde versucht, die Zelle weiter aufzureißen oder die Messung wurde abgebrochen. Das Flüssigkeitsgrenzflächenpotential (*liquid junction potential*) betrug 4,6–5,1 mV für die physiologische Badlösung 'Na⁺_{div}' in Kombination mit den verwendeten Pipettenlösungen und wurde wiederum durch die Pulse-Software korrigiert.

Zu Beginn jeder Messung wurden die Zellen mit der physiologischen Badlösung 'Na⁺_{div}' (s. Kapitel 2.4.1.4) superfusioniert, welche teilweise, je nach Versuchsziel, durch andere Lösungen ersetzt wurde. Falls zur Aktivierung eines Kanals Agonisten nötig waren und eine extrazelluläre Applikation möglich war, befanden sich die Agonisten in finaler Konzentration in den Badlösungen.

Für Messungen zum TRPM6-, TRPM7- und TRPM8-Kanal wurde standardmäßig eine magnesiumfreie Pipettenlösung verwendet, um die TRPM7-Ströme nicht zu hemmen. In manchen TRPM7-Versuchen wurde ausgehend von dieser Lösung die Magnesium-Konzentration variiert. Für die TRPM2-Messungen war eine höhere Calcium-Konzentration nötig, hier fand eine Pipettenlösung mit 100 nM freiem Magnesium Verwendung, der 20-100 μ M ADP-Ribose zugefügt wurde.

2.4.1.4 Lösungen

Badlösungen

Na⁺_{div}:

140mM NaCl; 5 mM CsCl ; 2 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 10 mM HEPES; 10 mM Glukose

Ca²⁺:

150 mM NMDGCl; **10 mM CaCl₂**

Mg²⁺:

150 mM NMDGCl; **10 mM MgCl₂**

Ba²⁺:

150 mM NMDGCl; **10 mM BaCl₂**

Verschiedene Magnesiumkonzentrationen:

130mM NaCl; **0 mM MgCl₂**; 10 mM HEPES; 50 mM Mannitol

130mM NaCl; **0,01 mM MgCl₂**; 10 mM HEPES; 50 mM Mannitol

130mM NaCl; **0,1 mM MgCl₂**; 10 mM HEPES; 50 mM Mannitol

130mM NaCl; **0,2 mM MgCl₂**; 10 mM HEPES; 50 mM Mannitol

130mM NaCl; **0,5 mM MgCl₂**; 10 mM HEPES; 50 mM Mannitol

130mM NaCl; **1 mM MgCl₂**; 10 mM HEPES; 50 mM Mannitol

130mM NaCl; **2 mM MgCl₂**; 10 mM HEPES; 50 mM Mannitol

130mM NaCl; **5 mM MgCl₂**; 10 mM HEPES; 45 mM Mannitol

130mM NaCl; **10 mM MgCl₂**; 10 mM HEPES; 30 mM Mannitol

130mM NaCl; **20 mM MgCl₂**; 10 mM HEPES; 0 mM Mannitol

NMDG⁺_{high}:

150 mM NMDG-Cl; 25 mM Mannitol

Mg²⁺_{high}:

100 mM MgCl₂; 50 mM Mannitol

Na⁺:

145 mM NaCl; 2 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 10 mM HEPES; 10 mM Glukose

NMDG⁺:

145 mM NMDG-Cl; 2 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 10 mM HEPES; 10 mM Glukose

Cholin⁺:

145 mM Cholin-Cl; 2 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 10 mM HEPES; 10 mM Glukose

Alle Badlösungen wurden mit NaOH oder HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Pipettenlösungen

Standard-Pipettenlösung für Messungen des TRPM2-Kanals:

130 mM CsCl; **0 mM MgCl₂**; 10 mM HEPES; 10 mM BAPTA; 1 mM HEDTA; 4,046 mM CaCl₂ (**100 nM freies Ca²⁺**)

Standard-Pipettenlösung für Messungen des TRPM7- und TRPM8-Kanals:

130 mM CsCl; **0 mM MgCl₂**; 10 mM HEPES; 10 mM BAPTA; 1 mM HEDTA; 0,635 mM CaCl₂ (**5,5 nM freies Ca²⁺**)

Für Messungen des TRPM7-Kanals mit unterschiedlichen intrazellulären Magnesiumkonzentrationen wurde die Magnesium- und Calciumchlorideinwaage so variiert, dass die Lösungen 5,5 nM freies Calcium und die gewünschte Konzentration an freiem Magnesium enthielten.

Alle Lösungen enthielten 130 mM CsCl, 10 mM HEPES, 10 mM BAPTA und 1 mM HEDTA sowie die in Tabelle 1 angegebenen Mengen Calcium- und Magnesiumchlorid.

Tab. 2.1: Totale Calcium- und Magnesiumchlorid-Konzentrationen, die in Anwesenheit von 10 mM BAPTA und 1 mM HEDTA in einer freien Calciumkonzentration von 5,5 nM und den angegebenen freien Magnesiumkonzentrationen resultierten.

CaCl₂ (mM)	MgCl₂ (mM)	freies Mg²⁺
0,636	0,806	100 µM
0,626	1,354	300 µM
0,617	1,753	500 µM
0,608	2,114	700 µM
0,596	2,632	1 mM
0,576	3,468	1,5 mM
0,558	4,257	2 mM
0,524	5,792	3 mM

Alle Pipettenlösungen wurden mit CsOH auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

Der freie Calcium- und Magnesium-Gehalt in den Pipettenlösungen wurde mit dem Programm CaBuf (<ftp://ftp.cc.kuleuven.ac.be/pub/droogmans/cabuf.zip>) kalkuliert.

2.4.2 Calciummessungen mittels Aequorin-Biolumineszenz

Das Prinzip dieser Methode basiert auf einer calciumabhängigen Biolumineszenz. Das Photoprotein Aequorin aus der Qualle *Aequorea victoria* ist in der Lage, das am Aequorin gebundene Substrat Coelenterazin in Anwesenheit von Calcium zu Coelenteramid zu oxidieren, wodurch es zur Lichtemission mit einer Wellenlänge von

etwa 470 nm kommt, die mit einem Photomultiplier aufgezeichnet werden kann. Da die Reaktion stark calciumabhängig ist, besteht die Möglichkeit, aus der Stärke der Lichtemission sehr genau die Menge des z.B. in Zellen einströmenden oder aus Zellorganellen entleerten Calciums zu berechnen. Durch Ermittlung der maximalen Lichtemission und somit Bestimmung des Aequoringehalts in der Zelle durch eine anschließende Zelllyse, ist auch ein quantitativer Vergleich zwischen verschiedenen Versuchen möglich. Dazu wird mittels folgender Gleichung die Höhe der Calciumantwort kalkuliert:

$$p[Ca^{2+}]_i = 0.332588 \times (-\log(k)) + 5.5593$$

wobei k das Biolumineszenzsignal pro Sekunde geteilt durch die Gesamt-Lumineszenz während der Messung darstellt.

2.4.2.1 Vorbereitung der Zellen

Für die Calciummessungen wurde 1 µg Kanalplasmid mit 50 ng Apoequorin (Aequorin ohne gebundenes Coelenterazin) mit fusioniertem eGFP in HEK293-Zellen kotransfiziert. Durch dieses Verhältnis der Mengen an Plasmid-DNA bestand eine ausreichende Wahrscheinlichkeit, dass jede Zelle mit Aequorin auch Kanälen enthielt. Das N-terminal kovalent gebundene eGFP-Protein am Aequorins diente der Proteinstabilität und zur Beurteilung der Transfektionseffizienz.

Die Zellen wurden etwa 24 h nach der Transfektion mit 1 ml phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Anschließend wurden sie in 1 ml HEPES-gepufferter Salzlösung (HBS, welches für TRPM7-Messungen immer ohne Magnesium angesetzt wurde) aufgenommen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Dann wurde für 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml HBS, dem 0,1% Colenterazin (Biaffin) zur Beladung des Apoequorins zugesetzt wurde, resuspendiert. Die Eppendorfgefäße wurden für eine halbe Stunde im Dunkeln aufbewahrt, dann folgte eine weitere Zentrifugation für 5 min und ein Waschschriff mit 1 ml HBS. Zuletzt wurde das Pellet erneut in 1 ml HBS aufgenommen und pro Probe 160 µl in die Vertiefungen einer 96-Loch-Schale mit Glasboden pipettiert, die dann in ein kombiniertes Fluoreszenz- und Lumineszenz-Messgerät für Mikrotiterplatten (FLUOstar Optima, BMG LabTechnologies GmbH) eingelegt wurde.

2.4.2.2 Messvorgang

Die Messungen erfolgten bei 37°C. Während der Messung wurde zunächst eine Lösung mit dem Agonisten appliziert, um eine Calciumantwort des Kanals zu erhalten. Für den TRPM7-Kanal war dies eine HBS-Lösung mit 20 mM Calcium und für den TRPM8-Kanal eine HBS-Lösung mit 10 μ M Icilin. Anschließend wurde in zwei Schritten eine Tritonlösung verwendet, die die Zelllyse und somit die Freisetzung und Reaktion sämtlichen Aequorins bewirkte. Die Abb. 2.1 zeigt einen exemplarischen Verlauf der Lichtemission während einer Messung.

Während der Messung wurde folgendes Protokoll angewandt (Angaben pro well):

- 20 s: 40 μ l Icilin- (bzw. Calcium-) Lösung
- 180 s: 10 μ l HBS mit 0,5% Triton X-100
- 220 s: 90 μ l HBS mit 0,5% Triton X-100 mit nachfolgendem Schütteln der Platte, um eine gleichmäßige Lyse zu erreichen

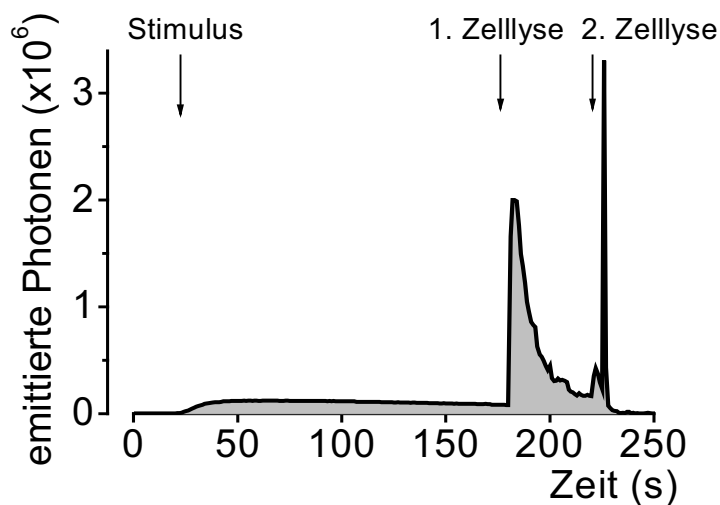


Abb. 2.1: Exemplarische Kurve einer Aequorin-basierten Calciummessung. 'Stimulus' bezeichnet den Zeitpunkt der Aktivierung mit dem passenden Stimulus, '1. Zelllyse' die Applikation von 10 μ l HBS mit Triton X100 und '2. Zelllyse' die Applikation von 40 μ l derselben Lösung.

Die Datenaufnahme erfolgte sekundlich und ab der 180. Sekunde alle zwei Sekunden, dabei wurde die Anzahl der emittierten Photonen pro Messintervall bestimmt.

2.4.2.3 Lösungen

PBS:

137 mM NaCl; 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH_2PO_4 ;

HBS für Messungen zum TRPM7:

140 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM CaCl; 10 mM HEPES; 5 mM Glukose

HBS für Messungen zum TRPM8:

140 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM CaCl; 1 mM MgCl; 10 mM HEPES; 5 mM Glukose

Alle Lösungen wurden mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

2.4.3 Auswertungen

Die Aufnahme und Auswertung der *patch clamp*-Messungen erfolgten mit dem Pulse-Programm der Firma HEKA (Version 8.70)

Die Datenerhebung bei den Aequorinmessungen erfolgte mit der dazugehörigen Software (Version 1.30 R3).

Für die graphische Darstellung und statistische Auswertung standen die Programme Excel (Version 2003) und Origin (Version 7G) zur Verfügung.

2.4.3.1 Berechnungen und Statistik

Die Daten werden bei den vorliegenden Untersuchungen im allgemeinen als Mittelwerte dargestellt, der Fehler ist als Standardfehler des Mittelwertes (SEM, *standard error of the mean*) angegeben. Auf vorhandene Signifikanzen wurde mithilfe des ungepaarten T-Test (*student's t-test*) geprüft. Die Anwendung des gepaarten T-Tests wird gesondert erwähnt. Eine Signifikanz wurde bei Werten von $p < 0,05$ akzeptiert, die Signifikanzniveaus werden in dieser Arbeit mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$) und *** ($p < 0,001$) angegeben.

Die Leitfähigkeiten wurden als Steigung im Spannungsbereich von -95 bis -100 mV mittels einer linearen Regression innerhalb des Pulse-Programms ermittelt. Hierbei wurden 5 bis 20 Spannungsrampen verwendet und die Steigungen gemittelt, was teilweise aufgrund einer zu schnellen Kinetik und somit einer zu starken Änderung der Steigung nicht möglich war. In diesen Fällen wurde die Leitfähigkeit nur anhand einer repräsentativen Rampe errechnet.

Die Permeabilitäten der Kanäle für die verschiedenen Ionen (P_{div}) relativ zur Natrium-Permeabilität (P_{Na}) wurden nach der Lewis-Gleichung (Lewis, 1979) berechnet, die auf der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung beruht:

$$\frac{P_{\text{div}}}{P_{\text{Na}}} = \frac{e^{((RP_{\text{div}} - RP_{\text{Na}}) R^{-1} T^{-1} F)} [Na]_o (1 + e^{(RP_{\text{div}} R^{-1} T^{-1} F)})}{4 [div]_o}$$

wobei $[Na]_o$ die extrazelluläre Natriumkonzentration und $[div]_o$ die extrazelluläre Divalentenkonzentration darstellt. RP_{Na} gibt das Umkehrpotential für Natriumströme wieder und RP_{div} das für Divalentenströme. R ist die Gaskonstante, T die absolute Temperatur und F die Faraday-Konstante.

Für die Werte der halbmaximalen Inhibierung (IC_{50}) wurde eine Ausgleichskurve nach Hill mit folgender Formel berechnet:

$$y = 1 * x^n / (k^n + x^n)$$

wobei n den Hill-Koeffizienten bzw. die Steigung verkörpert und k den Wert der halbmaximalen Inhibierung (IC_{50}).

2.4.3.2 Aminosäuresequenzvergleiche

Die Aminosäuresequenzvergleiche zur phylogenetischen Analyse wurden mit dem Programm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) durchgeführt. Die Tabelle 2.1 zeigt die analysierten Gene inklusive der in dieser Arbeit zugewiesenen Bezeichnungen sowie ihrer Namen in den entsprechenden Gendatenbanken.

Tabelle 2.2: Für die Sequenzanalysen verwendete Organismen

Organism and Taxonomy ID ^a	Protein name	Gene name/ID
<i>Monosiga brevicollis</i> , 81824	mbTRPM2-like 1	fgenes2_pg.scaffold_32000106 ^b
	mbTRPM2-like 2	fgenes2_pg.scaffold_19000100 ^b
<i>Nematostella vectensis</i> , 45351	nvTRPM2-like 1	estExt_fgenes1_pg.C_6220005 ^b
	nvTRPM2-like 2	e_gw.12.28.1 ^b
	nvTRPM2-like 3	e_gw.63.18.1 ^b
<i>Lottia gigantea</i> , 225164	lgTRPM2-like lg	fgenes2_pg.C_sca_30000080 ^b
	TRPM3-like 1	estExt_fgenes2_pg.C_sca_50283 ^b
	lgTRPM3-like 2	e_gw1.1.1006.1 ^b
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> , 7668	spTRPM2-like	LOC584520 ^c
	spTRPM3-like 1	LOC580138 ^c
	spTRPM3-like 2	LOC587583 ^c
<i>Caenorhabditis elegans</i> , 6239	ceGON-2	Gon-2,172646 ^c
	ceGTL-1	Gtl-1,178031 ^c
	ceGTL-2	Gtl-2,178036 ^c
<i>Drosophila melanogaster</i> , 7227	dmTRPM	TRPM, 36694 ^c

<i>Ciona savignyi</i> , 51511	csTRPM2-like	SINCSAVG00000002447 ^d
	csTRPM3-like	SINCSAVG00000005568 ^d
<i>Branchiostoma floridae</i> , 7739	bfTRPM2-like	fgenesh2_pg.scaffold_169000061 ^b
	bfTRPM3-like 1	fgenesh2_pg.scaffold_31000034 ^b
	bfTRPM3-like 2	estExt_fgenesh2_pg.C_1390073 ^b
<i>Danio rerio</i> , 7955	drTRPM2	ENSDARG00000060567 ^d
	drTRPM6	LOC567781 ^c
	drTRPM7	ENSDARG00000036232 ^d
<i>Homo sapiens</i>	hsTRPM2	TRPM2, 7226 ^c
	hsTRPM6	TRPM6, 140803 ^c
	hsTRPM7	TRPM7, 54822 ^c

^awww.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/

^bgenome.jgi-psf.org/euk_home.html

^cwww.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez

^bwww.ensembl.org

3 ERGEBNISSE

Der erste Teil dieser Arbeit beschreibt die funktionelle Analyse einer in einem HSH-Patienten gefundenen Mutation im TRPM6-Protein; im zweiten Teil werden die Ergebnisse zu Untersuchungen gezielter Mutationen im TRPM7 und anderen TRPM-Proteinen vorgestellt, die zum Verständnis der Hintergründe der ungewöhnlich diversen Permeabilität innerhalb dieser Kanal-Subfamilie beitragen sollen. Dabei wird auch ein Augenmerk auf die Evolution von TRPM-Proteinen einen möglichen Zusammenhang zwischen Evolution und Permeationseigenschaften gelegt.

3.1 Patientenmutante P1017R im TRPM6-Protein

Die Beteiligung des TRPM6-Proteins an der Ausprägung der Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie (HSH) wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wird eine bis dahin unbekannte Mutation im TRPM6-Gen charakterisiert, die zu einem nicht-konservativen Aminosäureaustausch von Prolin zu Arginin führt.

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Mutation wurde die entsprechende Mutation P1017R in die Spleiß-Variante 1A der TRPM6-cDNA eingebaut und im heterologen Expressionssystem untersucht. Um die gefundene Mutante und ihr Äquivalent im TRPM7-Protein, P1040R, adäquat untersuchen zu können, wurden Zelllinien generiert, die das TRM6- bzw. TRPM7-Protein nach Induktion stabil exprimieren. Anschließend wurden in diesen Zelllinien sowie in HEK293-Zellen die mutierten TRPM6- und TRPM7-Proteine transient exprimiert und anschließend funktionell analysiert.

Im folgenden werden zunächst die verwendeten Zelllinien charakterisiert und anschließend die Auswirkungen der Mutation P1017R im TRPM6-Protein sowie der homologen Mutation P1040R im TRPM7-Protein bei transienter Expression dargestellt.

3.1.1 Charakterisierung der Zelllinien

Um den TRPM6-Kanal funktionell analysieren zu können und die Auswirkungen der Mutationen auf die Heteromultimerisierung der Kanalproteine zu untersuchen, war eine Koexpression der verschiedenen Kanalproteine notwendig. Die cDNAs dieser

Proteine sind jedoch aufgrund der Kinasedomäne sehr lang und werden somit nur wenig effektiv transfiziert. Deswegen bestand keine ausreichende Sicherheit, dass bei einer transienten Expression von zwei verschiedenen Kanalproteinen auch beide in der gleichen Zelle exprimiert werden. Zudem gab es keine Kontrollmöglichkeit, ob eine Zelle bei der Transfektion auch beide Plasmide aufgenommen hat. Deswegen wurden für die Koexpressionen Zelllinien verwendet, die das TRPM6- oder TRPM7-Protein stabil exprimieren. Bei Bedarf konnte dann ein zweites, eYFP- oder eGFP-fusioniertes Protein in dieser Zelllinie exprimiert werden und fluoreszierende Zellen waren so theoretisch positiv für beide Kanalproteine.

Zur Verfügung standen die induzierbaren und das jeweilige Kanalprotein stabil exprimierenden Zelllinien, TRPM7^{pIND} und TRPM6^{pIND}. Um sicherzustellen, dass diese Zelllinien funktionsfähiges Protein bilden und somit auch geeignete Systeme zur gleichzeitigen Expression verschiedener Kanalproteine sind, wurden sie zunächst mittels *patch clamp*-Messungen in der Ganzzellkonfiguration funktionell untersucht. Dazu wurden die Zellen induziert und übereinstimmend mit verschiedenen Literaturangaben innerhalb von 18-24 h gemessen (Nadler et al., 2001; Hofmann et al., 2002). Dabei wurde eine (annähernd) physiologische Badlösung (Na^+_{div}) verwendet, sowie eine magnesiumfreie Pipettenlösung, um die TRPM7-Ströme möglichst wenig zu beeinträchtigen.

Zudem sollte sichergestellt werden, dass die Insertion des Ecdyson-sensitiven Promotors nicht schon eine Änderung der Eigenschaften im Vergleich zu HEK293-Zellen mit sich bringt. Aus diesem Grund wurde auch die Stromentwicklung in der EcR293-Zelllinie, die die Basis für die Entwicklung der stabil exprimierenden Zelllinien darstellt, vor und nach Induktion untersucht und mit den basalen Strömen in HEK293-Zellen verglichen.

3.1.1.1 TRPM7^{pIND}

Die Zellen wurden mittels Aufwärtssrampen von -100 bis +100 mV gemessen und entwickelten abhängig von Expressionsstärke und Zugriffswiderstand den charakteristischen TRPM7-Strom, der sich in einer ausgeprägt auswärts rektifizierenden Strom-Spannungs-Beziehung mit minimalen Einwärtsströmen zeigte. Diese typische Beziehung war auch in den meisten nicht induzierten Zellen zu beobachten, da durch die Auswahl der Pipettenlösung die in HEK293-Zellen endogen vorkommenden TRPM7-Kanäle sichtbar wurden (Abb. 3.1 B). Die hohen Cäsium-Auswärtsströme boten eine bessere Vergleichbarkeit als die Einwärtsströme, welche sich

auch bei der Entwicklung starker Auswärtsströme kaum veränderten. Somit wurden lediglich die Auswärtsströme zur Kalkulation von Stromdichten herangezogen, die Einwärtsströme stellten einen guten Indikator für eventuell auftretende Leckströme dar.

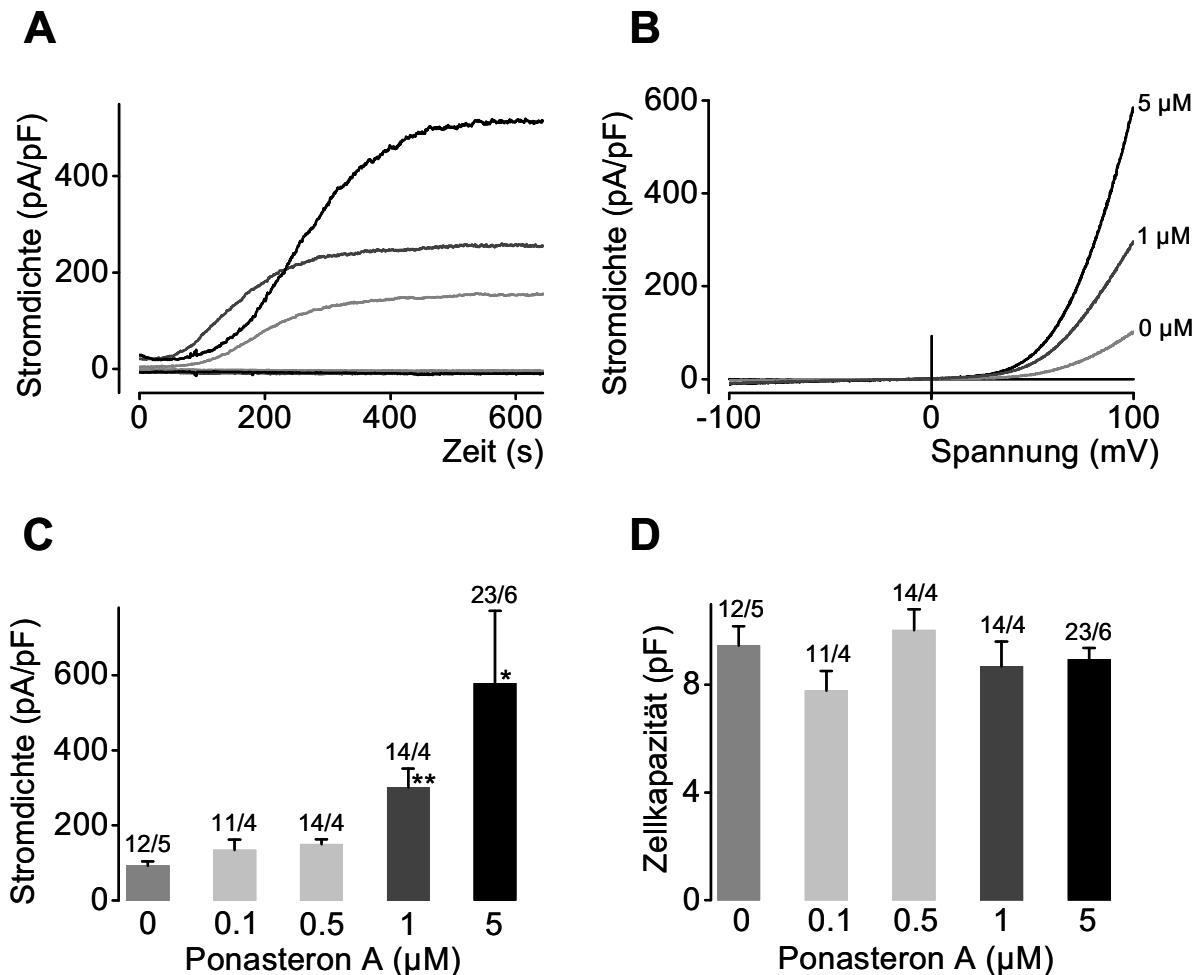


Abb. 3.1: Elektrophysiologische Charakterisierung der Zelllinie TRPM7^{IND}

A: Exemplarische Stromdichte-Zeitverläufe bei einem Haltepotential von +100 und -100 mV nach Induktion mit 0 μM (hellgrau), 1 μM (dunkelgrau) und 5 μM (schwarz) Ponasteron A; **B:** Entsprechende Stromdichte-Spannungs-Beziehungen zu A während der Plateauphase; **C:** Durchschnittliche Stromdichten bei +100 mV nach Induktion mit unterschiedlichen Konzentrationen Ponasteron A; **D:** durchschnittliche Membrankapazitäten als Maß für die Größe der gemessenen Zellen bei den verschiedenen Ponasteron A-Konzentrationen. Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen und unabhängigen Induktionen; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Die Strom-Zeitverläufe waren einheitlich und zeigten einen steten Stromanstieg und ein Erreichen des Maximums nach 200 bis 450 s, auf das eine ausdauernde Plateauphase folgte (Abb. 3.1 A). Bei Induktion der Zelllinie zeigte sich, dass erst ab einer Ponasteron A-Konzentration von 1 μM signifikant höhere Ströme als bei untransfizierten Zellen auftraten (Abb. 3.1 C). Bei einer Induktion mit 5 μM

Ponasteron A war noch einmal eine deutliche Stromzunahme festzustellen, wobei hier die Stromhöhen weit stärker variierten als bei den anderen Konzentrationen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die durch die Pulse-Software aufgezeichneten Zellkapazitäten, ein Maß für die Größe der Membranoberfläche der gemessenen Zellen, bei den verschiedenen Induktionen im Durchschnitt nicht signifikant unterschiedlich waren (Abb. 3.1 D). Somit hatten die verschiedenen Ponasteron A-Konzentrationen keinen Einfluß auf die Größe der gemessenen Zelle. In den nicht induzierten Zellen wurden bei einem Haltepotential von +100 mV Stromhöhen im Bereich von 600 pA bis 1,5 nA gemessen, daraus resultierte eine mittlere Stromdichte von 93 pA/pF. Bei maximaler Induktion mit 5 μ M Ponasteron A variierten die Stromdichten von 70 bis 3800 pA/pF. Obwohl es sich um eine monoklonale Zelllinie handelt, zeigte sich also eine enorme Varianz in den Stromantworten, so dass für eine aussagekräftige Statistik oft eine große Anzahl an Messungen nötig war.

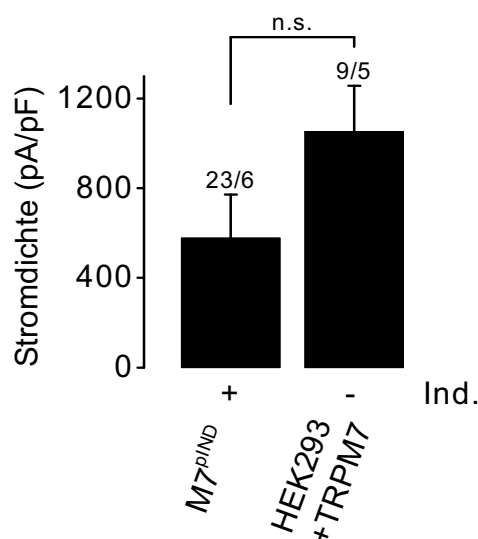


Abb. 3.2: Analyse der Stromdichten in der Zelllinie TRPM7^{pIND} und bei transienter Expression von TRPM7-Protein in HEK293-Zellen
Durchschnittliche Stromdichten bei einem Haltepotential von +100 mV bei Messungen der mit 5 μ M Ponasteron A induzierten (+) TRPM7^{pIND}-Zelllinie (M7^{pIND}) und nach transienter Expression von TRPM7-Protein in HEK293-Zellen (HEK293 + TRPM7) ohne Induktion (-). Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen und unabhängigen Transfektionen; n.s. = nicht signifikant

Die mittlere Stromdichte in den maximal induzierten TRPM7^{pIND}-Zellen war mit 675 pA/pF nur 1,8fach geringer als bei transienter Expression von TRPM7-Protein (1053 pA/pF) (Abb. 3.2). Diese Beobachtung stimmt mit dem Ergebnis von Proteinmengen-Bestimmungen (*Western Blot*) von maximal induzierten bzw. das

TRPM7-Protein transient exprimierenden Zellen überein, in denen ebenfalls vergleichbare Mengen Protein nachgewiesen werden konnten (Chubarov et al., 2007).

Anschließend wurde die Auswirkung einer dauerhaften Expression von TRPM7-Protein auf die Zellen untersucht. Dazu wurden Zellen der TRPM7^{pIND}-Zelllinie auf Glasplättchen ausgesät, nach zwei Tagen induziert und weitere 48 Stunden später mikroskopisch untersucht. Zum Vergleich wurden Aufnahmen von gleich alten, nicht induzierten aber mit 5 μ l Ethanol versetzten, Zellen gemacht. Während die nicht induzierten Zellen keine Abweichung der Zellmorphologie vom bekannten Bild zeigten, waren bei den induzierten extreme Veränderungen zu beobachten. Sie bildeten Zellhaufen und rundeten sich ab, was auf ein Absterben der Zellen hindeutet (Abb. 3.3). Eine dauerhafte Überexpression des TRPM7-Proteins scheint also die Lebensfähigkeit der Zellen stark zu beeinträchtigen.

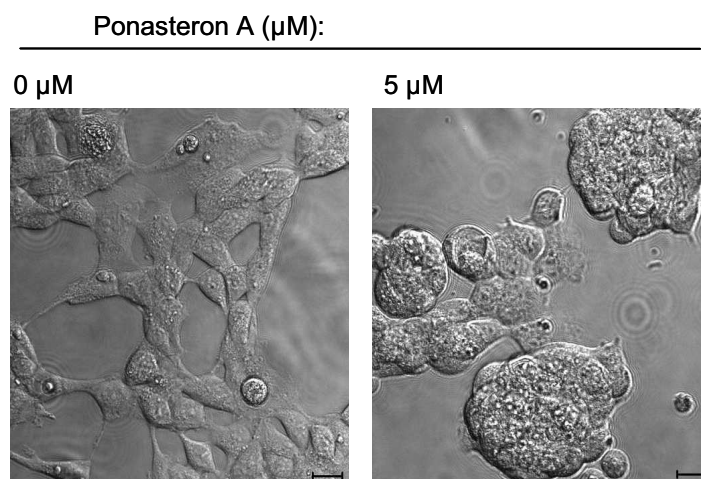


Abb. 3.3: Morphologie der Zelllinie TRPM7^{pIND}

Repräsentative Differential-Interferenzkontrast-Aufnahmen von TRPM7^{pIND}-Zellen bei Applikation von 5 μ l EtOH (links) und nach 48 Stunden Induktion mit 5 μ M Ponasteron A (rechts). Die Balken entsprechen 10 μ m

Zusammenfassend konnte die Zelllinie TRPM7^{pIND} als funktionell charakterisiert werden und war somit ein geeignetes Expressionssystem für Kotransfektionsversuche mit TRPM6-Protein. Dabei wurde die maximale Induktion mit 5 μ M Ponasteron A gewählt, da diese bezüglich der Stromdichten am besten vergleichbar mit einer transienten Expression des TRPM7-Kanalgens war.

3.1.1.2 TRPM6^{pIND}

Die TRPM6-Zelllinie wurde auf die gleiche Weise analysiert wie die vorangegangene. In der Zelllinie konnte keine nennenswerte Stromerhöhung durch die Induktion mit Ponasteron A festgestellt werden, die mittleren Stromdichten reichten lediglich von 121 pA/pF für nicht induzierte Zellen bis 150 pA/pF für die maximal induzierten (Abb. 3.4 C).

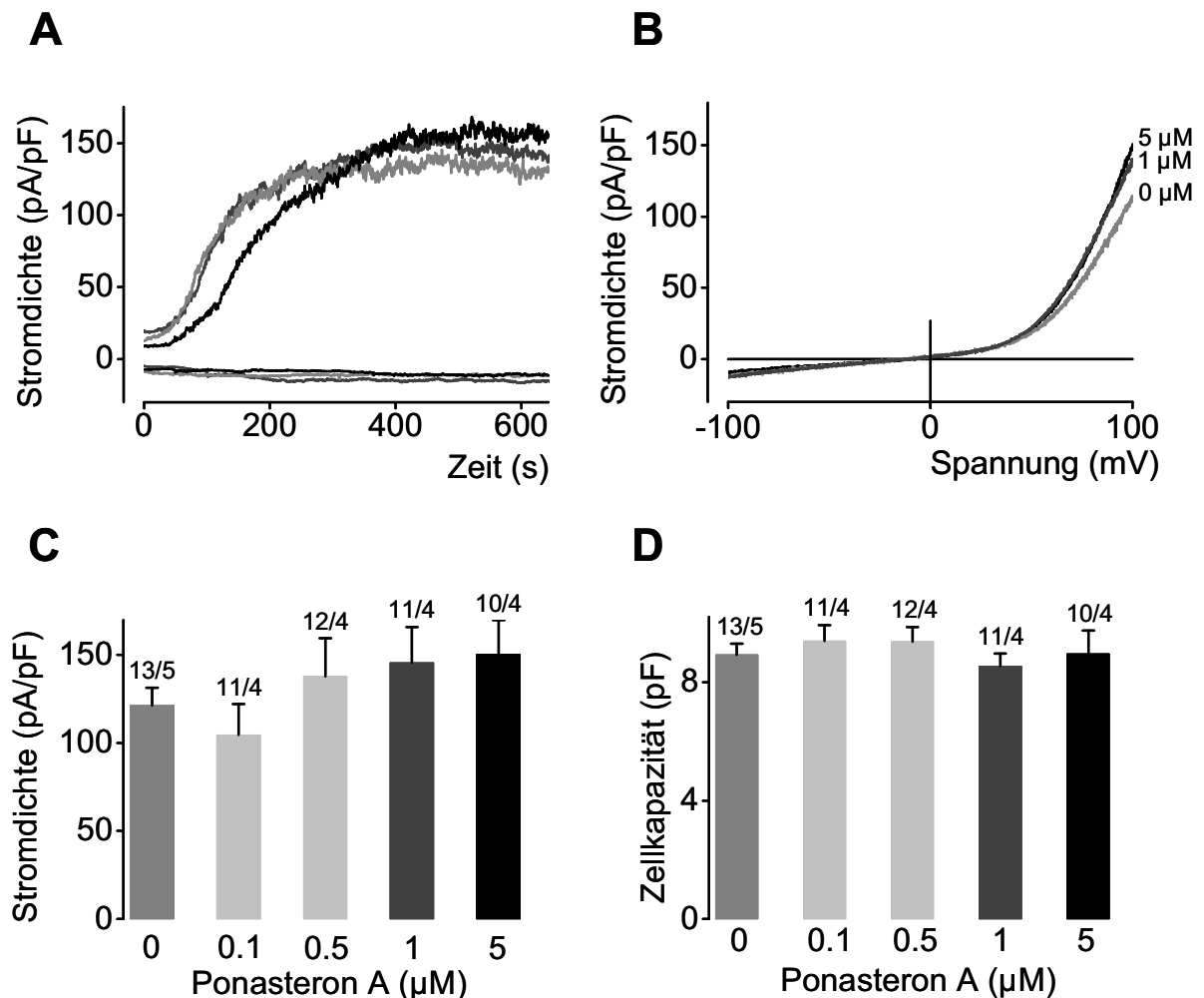


Abb. 3.4: Elektrophysiologische Charakterisierung der Zelllinie TRPM6^{pIND}

A: Exemplarische Stromdichte-Zeitverläufe bei einem Haltepotential von +100 und -100 mV nach Induktion mit 0 μM (hellgrau), 1 μM (dunkelgrau) und 5 μM (schwarz) Ponasteron A; **B:** Entsprechende Stromdichte-Spannungs-Beziehungen zu A während der Plateauphase; **C:** Durchschnittliche Stromdichten bei +100 mV nach Induktion mit unterschiedlichen Konzentrationen Ponasteron A; **D:** durchschnittliche Membrankapazitäten als Maß für die Größe der gemessenen Zellen bei den verschiedenen Ponasteron A-Konzentrationen. Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen und unabhängigen Induktionen.

Die mittlere Stromdichte war zwar bei einer Induktion ab 0,5 μM Ponasteron A um 20-30 pA/pF höher als in der nicht induzierten. Dies ist aber mutmaßlich auf das

Vorhandensein endogener TRPM7-Proteine zurückzuführen. Dieses konnte mit dem überexprimierten TRPM6-Protein funktionelle heteromultimere Kanäle bilden. Für eine Sättigung der endogen vorhandenen TRPM7-Untereinheiten mit TRPM6 war schon die Induktion mit 0,5 μM Ponasteron A ausreichend, so dass es zu keiner weiteren Stromzunahme bei höheren Ponasteron A-Konzentrationen kam.

Die Zellen wiesen im Rahmen der geringen Stromentwicklung Kinetiken und Strom-Spannungs-Beziehungen auf, die einem TRPM7- oder TRPM7/TRPM6-Strom glichen, diese waren aber auch in untransfizierten HEK293-Zellen zu beobachten und sind auf die Wahl der Pipettenlösung zurückzuführen (Abb. 3.4 A,B). Auch bei dieser Zelllinie konnten keine Unterschiede in der Größe der Zellkapazitäten bei Induktion mit Ponasteron A ausgemacht werden (Abb. 3.4 D). Der Nachweis, dass die Zelllinie nach der Induktion auch tatsächlich TRPM6-Protein exprimiert, wurde mithilfe von Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) erbracht. Zudem konnten Proteinmengen-Bestimmungen (*Western Blots*) und Immunfluoreszenzfärbungen mit einem TRPM6-spezifischen Antikörper das TRPM6-Protein in induzierten Zellen nachweisen, nicht aber in den nicht induzierten Zellen (Chubakov et al., 2007).

Um zu überprüfen, ob das TRPM6-Protein in der Zelllinie TRPM6^{pIND} als funktionsfähige Kanaluntereinheit in die Membran gelangt, wurden wiederum *patch clamp*-Experimente durchgeführt. Dazu wurden 2 μg TRPM7-Plasmid-DNA in der induzierten Zelllinie transient exprimiert. Als Vergleich erfolgte eine Transfektion der gleichen Menge TRPM7-Plasmid in HEK293-Zellen. In Ganzzellableitungen kam es bei der Expression in TRPM6^{pIND}-Zellen zu einer deutlich höheren Stromentwicklung als bei der Expression in HEK293-Zellen (Abb. 3.5).

Dies ist darauf zurückzuführen, dass das TRPM7-Protein in der Zelllinie TRPM6^{pIND} mit den TRPM6-Kanaluntereinheiten zusammen Heteromultimere bilden kann. So konnten insgesamt mehr funktionelle Kanäle gebildet werden als bei der Expression in der HEK293-Zelllinie, bei der es nur zur Bildung von TRPM7-Homotetrameren kam. Der Mittelwert der Stromdichten in den kotransfizierten Zellen stieg fast um fünfzig Prozent im Vergleich zur induzierten Zelllinie, wobei aufgrund der starken Varianzen der Stromdichten bei den Transfektionen mit TRPM7-Protein keine Signifikanz festgestellt werden konnte.

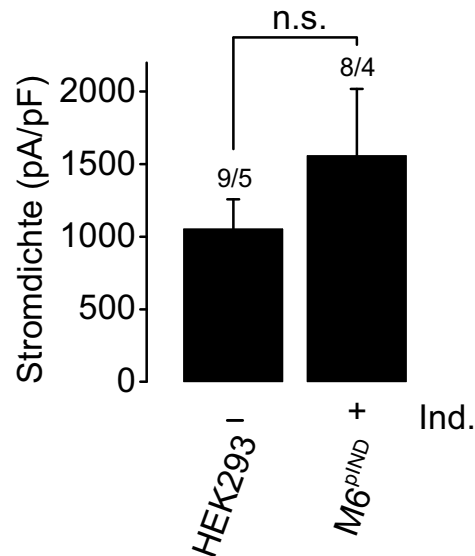


Abb. 3.5: Vergleich der Stromdichten bei transienter Expression von TRPM7-Protein in HEK293-Zellen und in der Zelllinie TRPM6^{pIND}. Durchschnittliche Stromdichten bei einem Haltepotential von +100 mV nach transienter Expression von TRPM7-Protein in HEK293-Zellen (HEK293) ohne Induktion (-) und TRPM6^{pIND}-Zellen (TRPM6^{pIND}) nach Induktion mit 5 μ M Ponasteron A (+). Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen und unabhängigen Transfektionen; n.s. = nicht signifikant

Bei Betrachtung der Morphologie der Zellen nach 48-stündiger Induktion mit Ponasteron A fiel auf, dass im Gegensatz zur TRPM7^{pIND}-Zelllinie keine Änderung der Morphologie zu beobachten war. Es kam weder zur Bildung von Zellhaufen, noch rundeten sich die Zellen stark ab (Abb. 3.6).

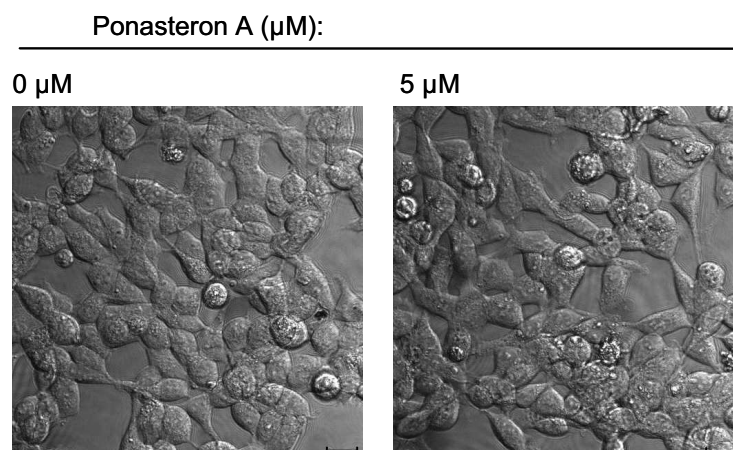


Abb. 3.6: Zellmorphologie der Zelllinie TRPM6^{pIND}. Repräsentative Differential-Interferenzkontrast-Aufnahmen von TRPM6^{pIND}-Zellen bei Applikation von 5 μ l EtOH (links) und nach 48 Stunden Induktion mit 5 μ M Ponasteron A (rechts). Die Balken entsprechen 10 μ m

Es konnte also nachgewiesen werden, dass in der Zelllinie TRPM6^{pIND} funktionsfähiges Protein exprimiert wurde. Es kam nicht zu Entwicklung signifikanter Ströme durch Induktion mit Ponasteron A, aber es wurde gezeigt, dass trotzdem TRPM6-Proteine vorhanden waren, die zur Heteromultimerisierung und Stromentwicklung im TRPM6/7-Komplex in der Lage waren. Somit war auch diese Zelllinie prinzipiell ein geeignetes Expressionssystem für Koexpressionen. Da aber bei einer Kotransfektion mit TRPM6-Protein oder dessen Mutanten keine Stromentwicklung zu erwarten war, wurden in den nachfolgenden Versuchen die TRPM6-Varianten in der Zelllinie TRPM7^{pIND} überexprimiert, um ihren Einfluß auf die Stromentwicklung von heteromultimeren TRPM6/7-Komplexen zu untersuchen.

3.1.1.3 Zelllinien im Vergleich

Um einen Eindruck von den Veränderungen zu erhalten, die durch die Generierung stabiler Zelllinien in der zugrunde liegenden HEK293-Zelllinie stattfinden, wurde auch die EcR293-Zelllinie, die die Grundlage zu den stabil exprimierenden Zelllinien bildet, analysiert. Dabei wurde nur die Stromentwicklung bei maximaler Induktion mit 5 µM Ponasteron A sowie von nicht induzierten Zellen untersucht. Zusätzlich wurden auch untransfizierte HEK293-Zellen gemessen. Die Strom-Spannungs-Beziehungen und Strom-Zeitverläufe in der EcR-Zelllinie unterschieden sich nicht von denen in den uninduzierten Zelllinien oder in HEK293-Zellen (Abb. 3.7 A,B).

Die mittleren Stromdichten befanden sich bei HEK293-Zellen, nicht induzierten TRPM7^{pIND}- und TRPM6^{pIND}- sowie induzierten und nicht induzierten EcR293-Zellen im Bereich von 92 bis 170 pA/pF. Aufgrund des engen Rahmens, in dem sich die Stromdichten bewegen, sind die Unterschiede zwischen den Stromdichten in HEK293-Zellen und denen in nicht induzierten EcR-Zellen sowie TRPM7^{pIND}-Zellen trotz vorhandener Signifikanz vernachlässigbar (Abb. 3.7 C).

Diese Unregelmäßigkeiten könnten darauf beruhen, dass die EcR-Zelllinie sowie die stabilen Zelllinien dem Stress durch die Selektionierung mit Antibiotika unterworfen sind. Dies könnte sich auf die Vitalität der Zellen auswirken, da diese viel Energie für den Abbau der antibiotisch wirksamen Substanzen aufwenden müssen und so nicht genügend Ressourcen für die Bildung und Aktivierung der endogenen Kanäle zur Verfügung besitzen.

Die Stromdichten bei den induzierten und nicht induzierten EcR293-Zellen waren nicht signifikant unterschiedlich, das lässt erkennen, dass die Aktivierung des Promotors durch den Ecdyson-Rezeptor nach Ponasteroninduktion keine

ungewollten Ströme hervorruft und dass dieser Rezeptor demnach tatsächlich nur die Transkription der direkt auf den Promotor folgenden cDNA aktiviert. Die Tatsache, dass es zwischen den Stromdichten von EcR293-, TRPM6^{pIND}- und TRPM7^{pIND}-Zellen keine signifikanten Unterschiede in den Stromdichten gibt, zeigt, dass dieser Promotor tatsächlich ausschließlich und sehr eng durch den Ecdysonrezeptor reguliert wird und es zu keiner unbeabsichtigten Expression der inserierten cDNA kam.

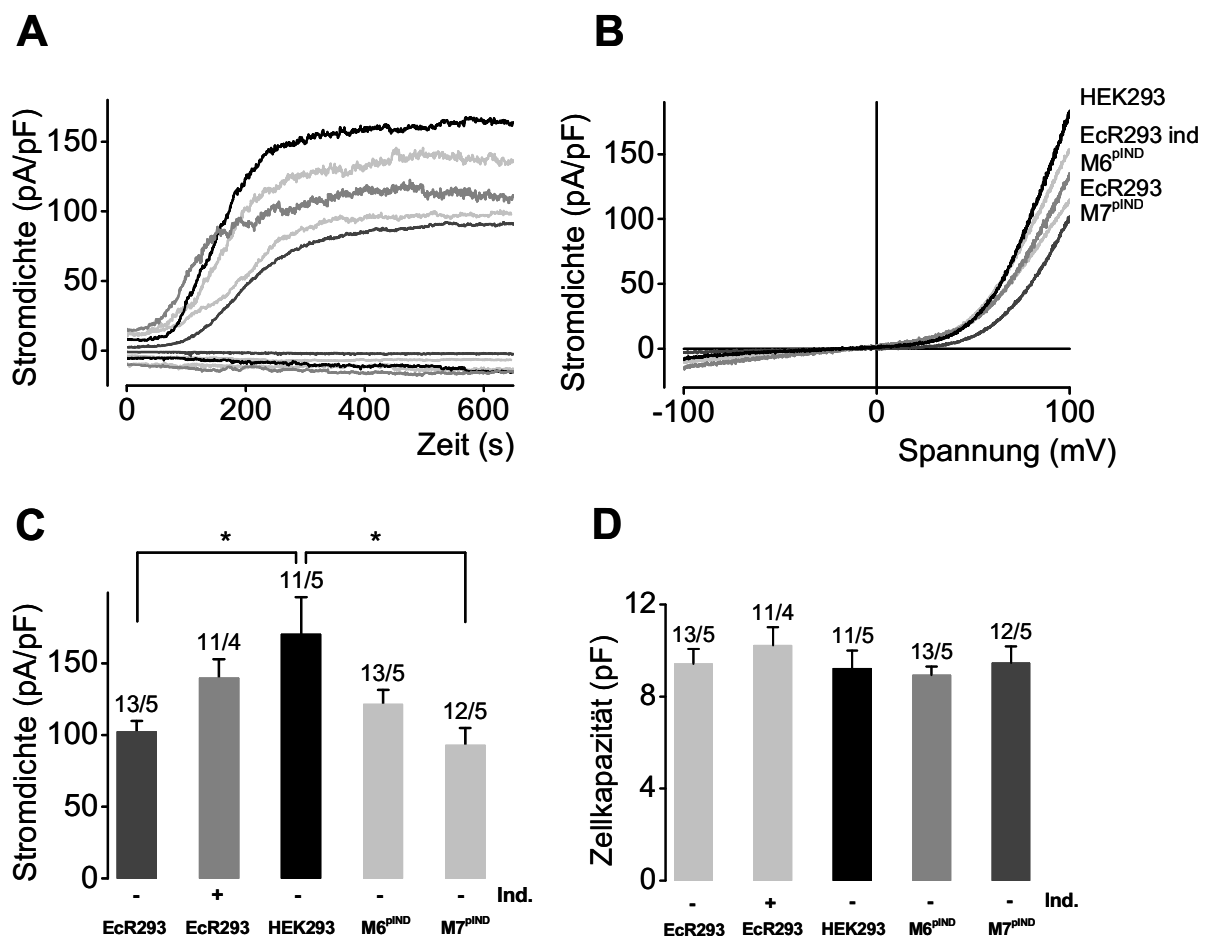


Abb. 3.7: Vergleich der Zelllinien EcR293, HEK293, TRPM6^{pIND} und TRPM7^{pIND}

A: Exemplarische Stromdichte-Zeitverläufe von EcR293-Zellen ohne Induktion und nach Induktion mit 5 μ M Ponasteron A (hellgrau) sowie HEK293- (schwarz), TRPM6^{pIND}- (grau) und TRPM7^{pIND}-Zellen (dunkelgrau) ohne Induktion bei einem Haltepotential von +100 und -100 mV; **B:** Entsprechende Stromdichte-Spannungs-Beziehungen zu A während der Plateauphase; **C:** Durchschnittliche Stromdichten von EcR293-Zellen ohne Induktion (-) und nach Induktion mit 5 μ M Ponasteron A (+) sowie HEK293-, TRPM6^{pIND} (M6^{pIND}) und TRPM7^{pIND}-Zellen (M7^{pIND}) ohne Induktion (-) bei einem Haltepotential von +100 mV; **D:** durchschnittliche Membrankapazitäten als Maß für die Größe der gemessenen Zellen. Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen und unabhängigen Induktionen; * = $p < 0,05$

Weiterhin wurden die initialen Stromdichten bei einem Haltepotential von +100 mV direkt nach Etablierung der Ganzzellkonfiguration und Start der Messung zwischen den verschiedenen Zelllinien analysiert. Diese Werte befanden sich im Bereich von 4,9 bis 62,2 pA/pF und waren ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 3.8).

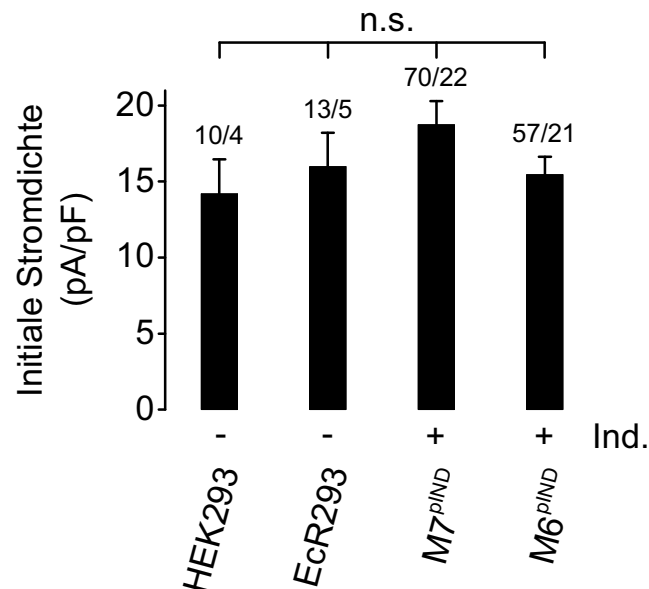


Abb. 3.8: Initiale Stromdichten der verschiedenen Zelllinien

Durchschnittliche Stromdichten bei einem Haltepotential von +100 mV direkt nach Etablierung der Ganzzellkonfiguration von HEK293- und EcR293-Zellen ohne Induktion (-) sowie der TRPM6^{pIND}- und TRPM7^{pIND}-Zelllinie nach Induktion mit 5 μ M Ponasteron A (+). Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen und unabhängigen Induktionen; n.s. = nicht signifikant

Es kann also ausgeschlossen werden, dass die TRPM7-Zelllinie nur aus dem Grund die höchsten Stromdichten erreichte, weil die Stromentwicklung auf einem höheren Niveau begann. Zudem zeigt sich hierdurch, wie eng der TRPM7 durch intrazelluläres Magnesium reguliert wird. Die TRPM7-typischen Ströme entwickelten sich erst, nachdem die Zelle mit der Pipettenlösung dialysiert und somit sämtliches Magnesium aus der Zelle gewaschen wurde.

3.1.2 HSH-Mutation P1017R im TRPM6-Protein

3.1.2.1 Funktionelle Analyse in *patch clamp*-Experimenten

Das TRPM6-Protein mit der Mutation P1017R wurde funktionell analysiert, um zu überprüfen, ob die Auswirkungen dieser Mutation für die Ausprägung der Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie verantwortlich oder an ihr beteiligt sein könnten.

Das mutierte Protein wurde transient in HEK293- sowie in induzierten und nicht induzierten TRPM7^{pIND}-Zellen exprimiert, um ihre Stromentwicklung und ihren Einfluß auf die entstehenden Kanalkomplexe zu untersuchen.

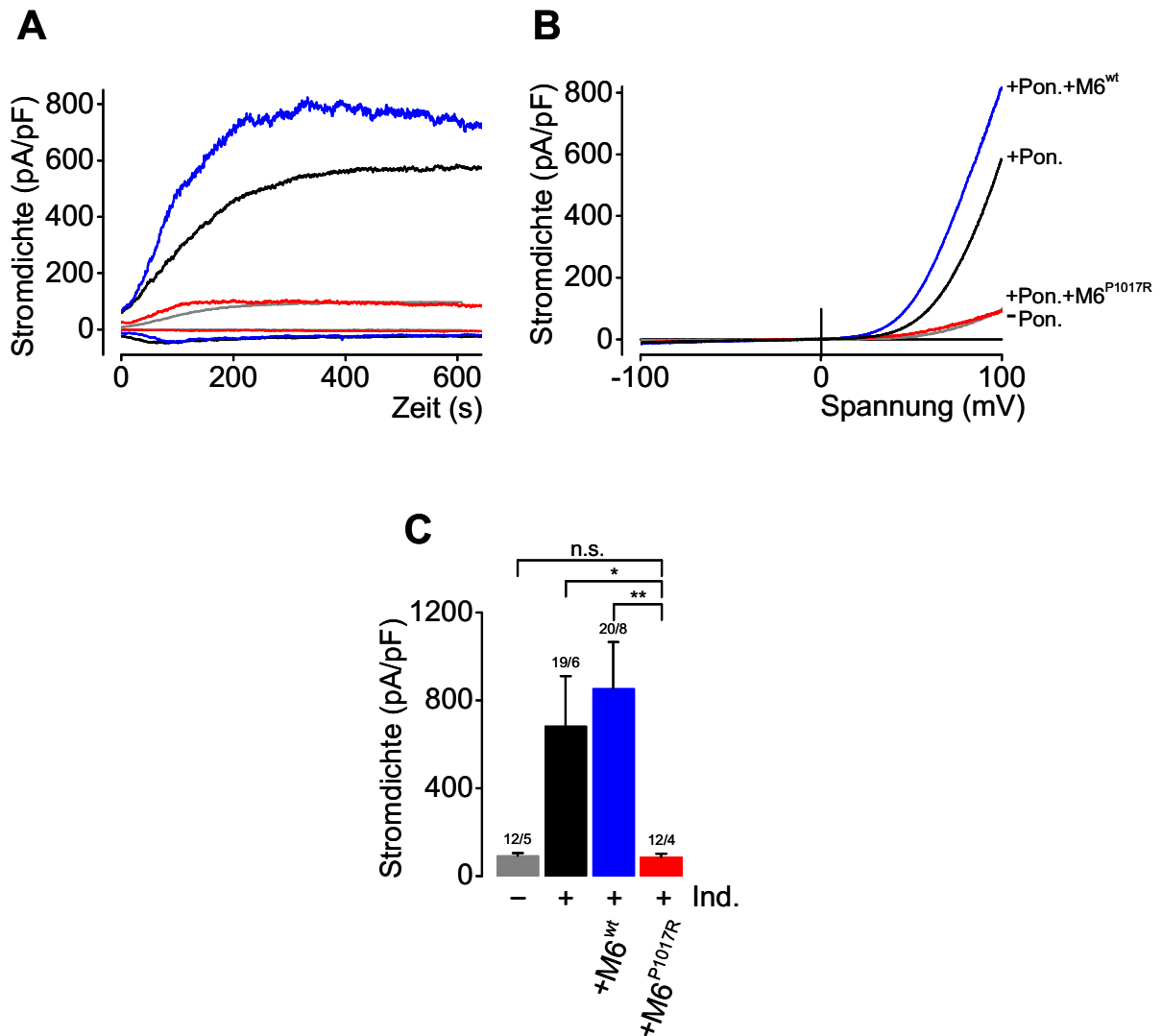


Abb. 3.9: Analyse von TRPM7^{pIND}-Zellen nach Induktion und nach zusätzlicher Transfektion von TRPM6^{WT} und TRPM6^{P1017R}-Protein

A: Exemplarische Stromdichte-Zeitverläufe der nicht induzierten (grau) und mit 5 μ M Ponasteron induzierten TRPM7^{pIND}-Zelllinie (schwarz) sowie bei der Expression von TRPM6^{WT}- (blau) bzw. TRPM6^{P1017R}-Protein (rot) und zusätzlicher Induktion bei einem Haltepotential von +100 und -100 mV; **B:** Entsprechende Stromdichte-Spannungs-Beziehungen zu A während der Plateauphase; **C:** Durchschnittliche Stromdichten der TRPM7^{pIND}-Zelllinie ohne Induktion (-) und nach Induktion mit 5 μ M Ponasteron (+) sowie bei zusätzlicher Expression von TRPM6^{WT}- (blau) und TRPM6^{P1017R}-Protein (rot) bei einem Haltepotential von +100 mV.

Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen und unabhängigen Induktionen; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; n.s. = nicht signifikant

Nach den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente (s. Kapitel 3.1.1.2) kann davon ausgegangen werden, dass das in der TRPM6^{pIND}-Zelllinie gebildete TRPM6-Protein nicht in der Lage ist, funktionelle Homotetramere zu bilden. Deswegen wurden im folgenden alle Versuche, die TRPM6-Proteine betrafen, als Koexpressionen in der Zelllinie TRPM7^{pIND} durchgeführt.

Dazu wurde das TRPM6^{P1017R}-Protein in TRPM7^{pIND}-Zellen transient exprimiert und anschließend eine Induktion der Zellen mit 5 μ M Ponasteron A durchgeführt. Zum Vergleich fand auch eine Transfektion derselben Zellen mit TRPM6^{WT}-Protein statt und die gefundenen Stromdichten wurden mit denen aus induzierten und nicht induzierten Zellen der TRPM7^{pIND}-Zelllinie verglichen. Die Zellen wurden in *patch clamp*-Messungen in der konventionellen Ganzzellkonfiguration mit den gleichen Lösungen wie in den vorangegangenen Experimenten (magnesiumfreie Pipettenlösung und physiologische Badlösung, ' Na^+_{div} ') gemessen und die maximalen Stromdichten bei einem Haltepotential von +100 mV bestimmt. Während das TRPM6^{WT}-Protein in der Lage war, prominente, in Kinetik und Strom-Spannungs-Beziehung TRPM6/7-typische Ströme zu erzeugen (Abb. 3.9 A,B), konnte bei Expression des mutierten Proteins keinerlei Stromerhöhung festgestellt werden. Darüber hinaus unterdrückte TRPM6^{P1017R} sogar die Ströme der induzierten Zelllinie und zeigte somit einen dominant-negativen Einfluss (Abb. 3.9 C).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das mutierte Protein nicht zur Bildung funktioneller Kanaluntereinheiten fähig war. Allerdings scheint es in der Lage zu sein, heteromultimere Komplexe mit TRPM7-Kanaluntereinheiten einzugehen, da es einen dominanten-negativen Einfluss auf den Strom in der induzierten TRPM7-Zelllinie ausübt. Somit ist es wahrscheinlich, dass die Mutation P1017R im TRPM6 maßgeblich an der Ausbildung der HSH beteiligt oder sogar dafür verantwortlich ist.

3.1.2.2 Das Äquivalent im TRPM7-Protein: P1040R

Um die Rolle des Prolins an dieser Position und somit die Bedeutung der beobachteten Auswirkungen zu überprüfen, wurde die entsprechende Mutation zu Arginin auch in das TRPM7-Protein eingeführt. Durch einen Aminosäuresequenz-Vergleich konnte ein Prolin an der Position 1040 als korrespondierende Aminosäure im TRPM7 bestimmt werden. Ein dreidimensionales Strukturmodell der Porenregionen beider Kanäle, basierend auf der Kristallstruktur des spannungsabhängigen Kaliumkanal KvAP aus dem Archaeobakterium *Aeropyrum pernix*, bestätigte zudem, dass dieses Prolin sich im TRPM7 vermutlich an einer vergleichbaren Stelle

innerhalb des Proteins befindet wie im TRPM6-Protein. In beiden Fällen ist dies eine Stelle innerhalb der mutmaßlichen Porenhelix, was eine direkte Beteiligung an der Permeation von Ionen durch den Kanal möglich macht (Abb. 3.10).

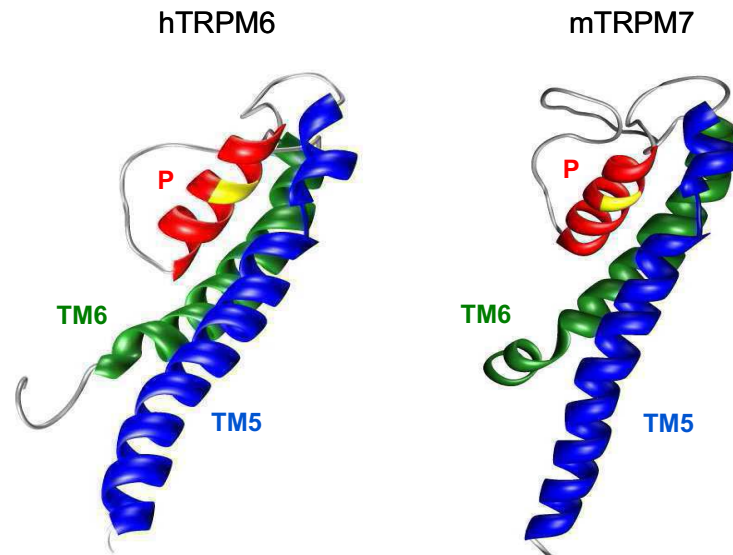


Abb. 3.10: Position des Prolins 1017 bzw. 1040 innerhalb des TRPM6- und TRPM7-Proteins

Molekulare Modelle des α -Karbongerüsts der TM5- (blau) und TM6-Segmente (grün) sowie der Porenhelix (P, rot) des hTRPM6 (links) und mTRPM7 (rechts) basierend auf der Kristallstruktur der korrespondierenden Region des KvAP-Kanals aus *Aeropyrum pernix*. Die gelb markierte Stelle kennzeichnet die Lokalisation von P1017 im hTRPM6-Protein bzw. von P1040 im mTRPM7-Protein.

Das TRPM7^{P1040R}-Protein wurde ebenfalls in der TRPM7^{pIND}-Zelllinie exprimiert und unter gleichen Bedingungen gemessen. Wie bei TRPM6^{P1017R} zeigte sich auch für diese Mutation, dass sie nicht in der Lage war, eine Stromerhöhung bei Koexpression mit TRPM7-Protein zu bewirken. Auch hier war eine Supprimierung des Stroms in induzierten TRPM7^{pIND}-Zellen zu beobachten. Zudem konnte diese Mutante sogar den basalen Strom in nicht induzierten TRPM7^{pIND}-Zellen signifikant unterdrücken, so dass das TRPM7^{P1040R}-Protein einen dominant-negativen Einfluss zeigte, welcher sogar stärker ausgeprägt war als der durch die Patientenmutante ausgeübte (Abb. 3.11 C).

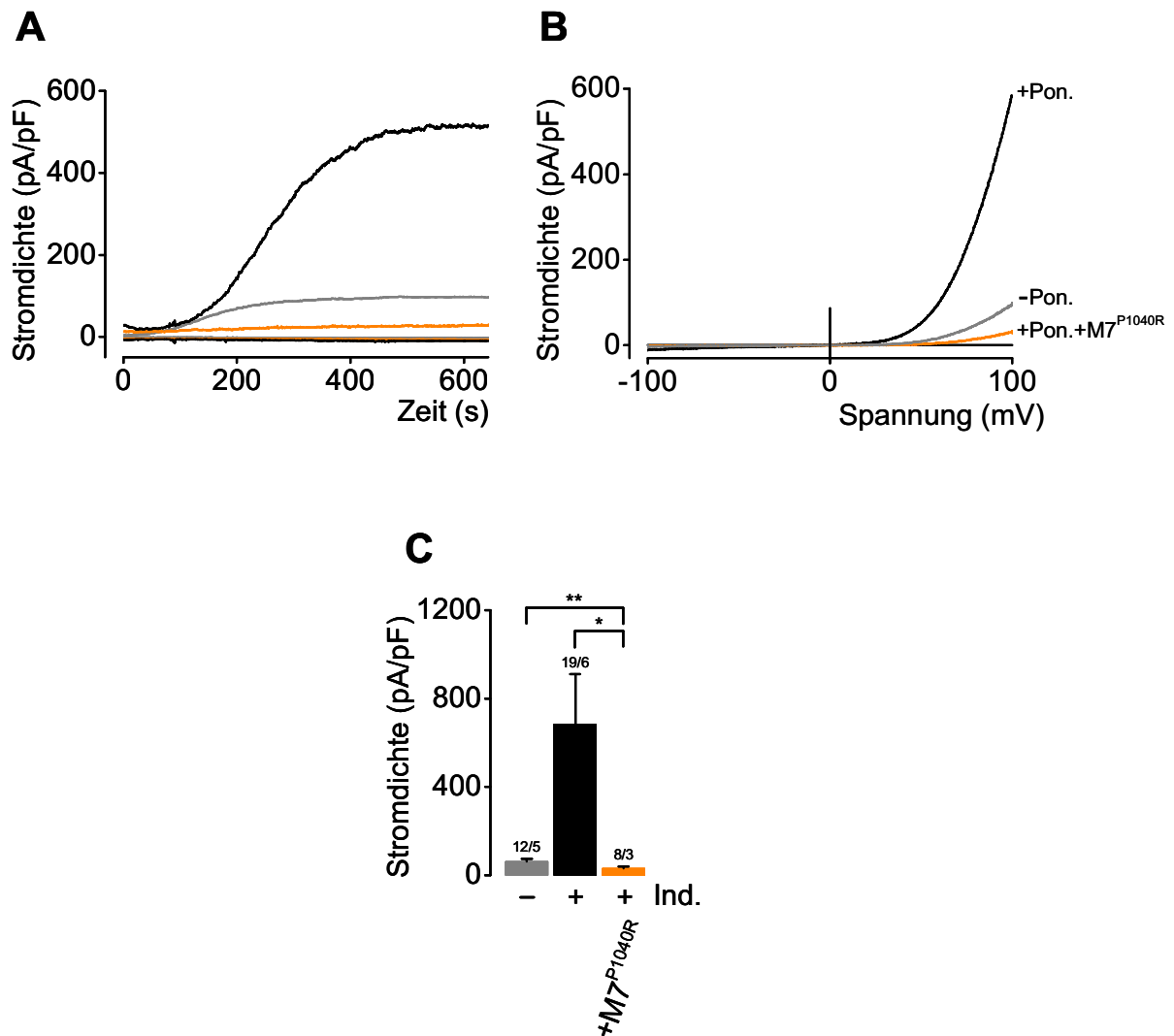


Abb. 3.11: Analyse von TRPM7^{P1040R}-Zellen nach Induktion und nach zusätzlicher transienter Transfektion von TRPM7^{P1040R}-Protein

A: Exemplarische Stromdichte-Zeitverläufe der nicht induzierten (grau) und mit 5 μ M Ponasteron A induzierten TRPM7^{P1040R}-Zelllinie (schwarz) sowie bei der transienten Expression von TRPM7^{P1040R}-Protein (orange) und zusätzlicher Induktion bei einem Haltepotential von +100 und -100 mV; **B:** Entsprechende Stromdichte-Spannungs-Beziehungen zu A während der Plateauphase; **C:** Durchschnittliche Stromdichten der TRPM7^{P1040R}-Zelllinie ohne Induktion (-) und nach Induktion (+) mit 5 μ M Ponasteron A sowie bei zusätzlicher transienter Expression von TRPM7^{P1040R}-Protein (rot) bei einem Haltepotential von +100 mV.

Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen und unabhängigen Induktionen; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

3.1.2.3 Einfluss auf endogenen MIC-Ströme

Es wird allgemein angenommen, dass der TRPM7-Kanal das molekulare Substrat von magnesium-inhibierten Kationenströmen ist, sogenannten MIC (*magnesium-inhibited cation*)-Strömen oder auch MagNuM (*magnesium-nucleotide-inhibited*

metal)-Strömen, die in HEK293- und vielen anderen Zelltypen endogen vorkommen (zusammengefasst in (Clapham, 2002)), wobei der endgültige Beweis hierfür noch erbracht werden muss. Da TRPM6^{P1017R}- und TRPM7^{P1040R}-Proteine bereits einen dominant-negativen Einfluss auf die Ströme in induzierten TRPM7^{pIND}-Zellen hatten und TRPM7^{P1040R} sogar auf den Strom in nicht induzierten TRPM7^{pIND}-Zellen, wurden sie in einem weiteren Versuch auch in HEK293-Zellen exprimiert.

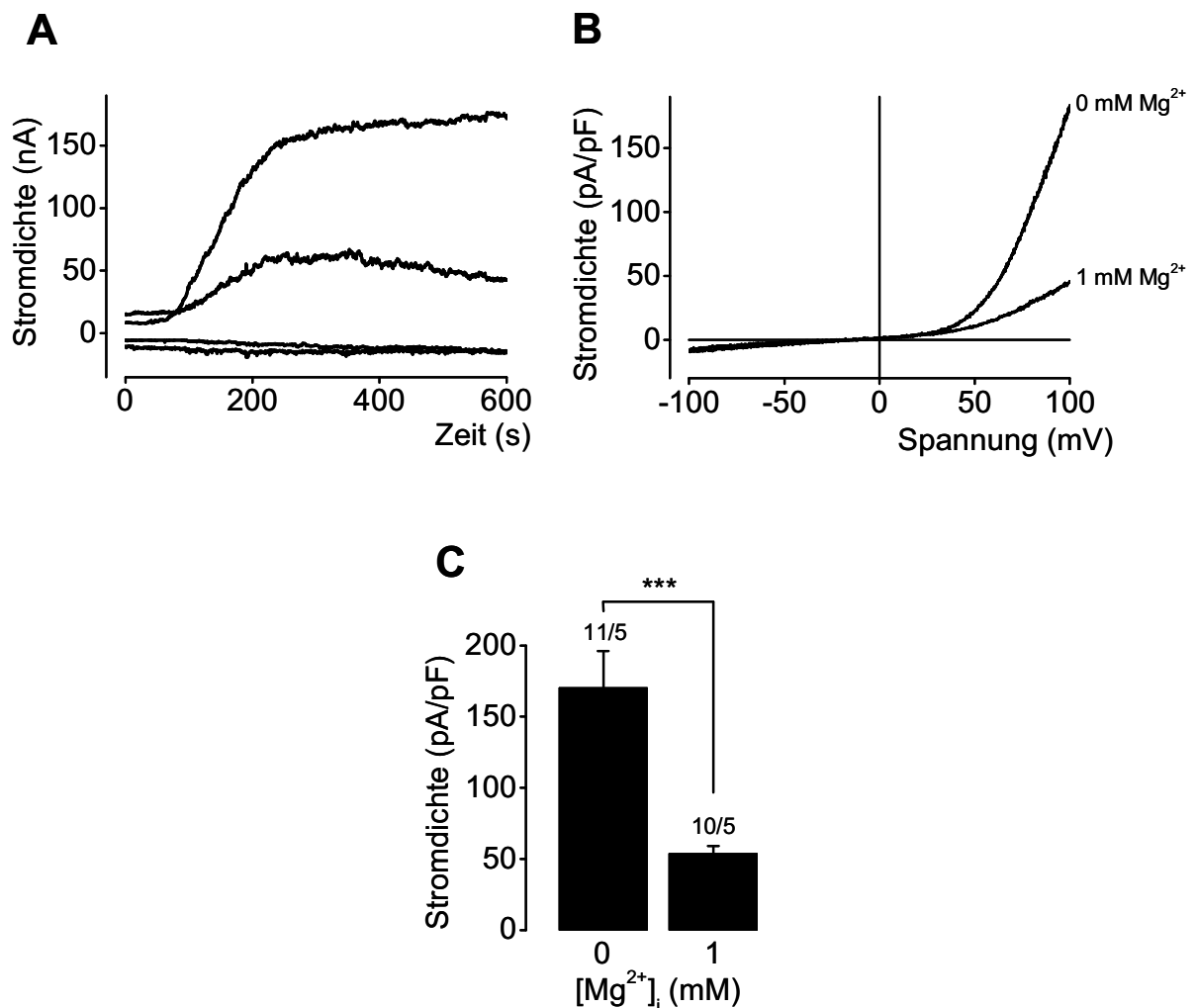


Abb. 3.12: Bestimmung von MIC-Strömen in HEK293-Zellen

A: Exemplarische Stromdichte-Zeitverläufe untransfizierter HEK293-Zellen mit 0 bzw. 1 mM Magnesium in der intrazellulären Lösung bei einem Haltepotential von +100 und -100 mV; **B:** Entsprechende Stromdichte-Spannungs-Beziehungen zu A; **C:** Durchschnittliche Stromdichten von untransfizierten HEK293-Zellen mit 0 bzw. 1 mM Magnesium in der intrazellulären Lösung bei einem Haltepotential von +100 mV.

Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen und unabhängigen Messtage: *** = < 0,005

Zunächst wurde der Anteil des MIC-Stromes am endogenen Strom der HEK293-Zellen gemessen, indem für die Messungen vergleichend die zuvor verwendete Pipettenlösung ohne Magnesium und eine mit 1 mM Magnesium verwendet wurde.

Während der Strom bei den Messungen mit Magnesium in der Pipettenlösung nur eine Stromdichte von gut 50 pA/pF aufwies, stieg er bei Verwendung der magnesiumfreien Pipettenlösung bis auf 170 pA/pF (Abb. 3.12).

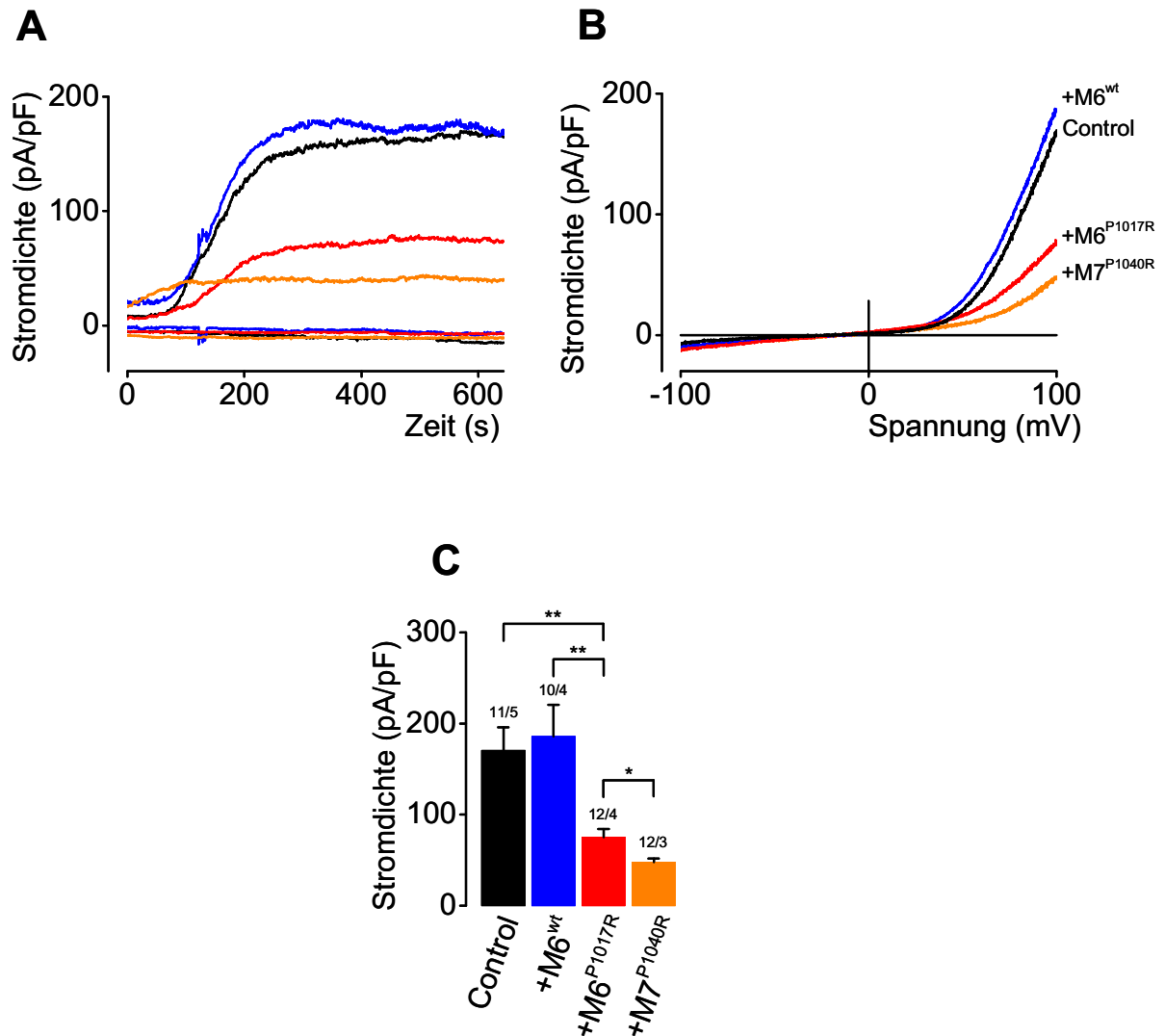


Abb. 3.13: Analyse von untransfizierten HEK293-Zellen und nach transien-ter Transfektion von TRPM6^{WT}, TRPM6^{P1017R}- und TRPM7^{P1040R}-Protein

A: Exemplarische Stromdichte-Zeitverläufe von untransfizierten HEK293-Zellen (schwarz) und nach transien-ter Transfektion von TRPM6^{WT}- (blau), TRPM6^{P1017R}- (rot) und TRPM7^{P1040R}-Protein (orange) bei einem Haltepotential von +100 und -100 mV; **B:** Entsprechende Stromdichte-Spannungs-Beziehungen zu A während der Plateauphase; **C:** Durchschnittliche Stromdichten von untransfizierten HEK293-Zellen (schwarz) und nach transien-ter Transfektion von TRPM6^{WT}- (blau), TRPM6^{P1017R}- (rot) und TRPM7^{P1040R}-Protein (orange) bei einem Haltepotential von +100 mV.

Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen und unabhängigen Induktionen; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Bei der Transfektion des TRPM6^{WT}-Proteins in HEK293-Zellen zeigte sich wiederum, dass die Zellen auch hier nicht in der Lage waren, signifikante Ströme zu entwickeln. Die Stromdichten hatten etwa die gleiche Höhe wie die in untransfizierten

HEK293-Zellen. Im Gegensatz dazu bewirkte die HSH-Mutante im TRPM6 eine hochsignifikante Stromreduzierung der MIC-Ströme in HEK293-Zellen. Ein noch stärkerer Effekt war bei der Expression von TRPM7^{P1040R} zu sehen (Abb. 3.13). Diese Mutante konnte die endogenen HEK293-Ströme auf eine mittlere Stromdichte von 47 pA/pF reduzieren, also annähernd den Wert, den im vorherigen Versuch die HEK293-Zellen bei der Verwendung einer Pipettenlösung mit 1 mM Magnesium erreichten. TRPM7^{P1040R} bewirkte also eine Stromreduktion um genau den Anteil, den die MIC-Ströme am Gesamtstrom der endogenen HEK293-Ströme hatten.

Beide Mutationen waren also tatsächlich in der Lage, auch den in HEK293-Zellen vorkommenden MIC-Strom signifikant zu unterdrücken. Das zeigt zum einen, wie stark der dominant-negative Einfluss dieser beiden Mutanten ist und es ist zum anderen auch ein weiterer Hinweis darauf, dass MIC-Ströme in HEK293-Zellen tatsächlich durch TRPM7-Kanäle hervorgerufen werden.

3.1.2.4 Oberflächenexpression der TRPM6- und TRPM7-Varianten

Um Aufschluss über die gestörte Funktion der mutierten Kanäle aus TRPM6^{P1017R}- und TRPM7^{P1040R}-Protein und die Ursache für den dominant negativen Einfluss der mutierten Proteine zu erhalten, wurden diese Proteine mit einem carboxyterminal fusionierten eYFP-Protein in HEK293-Zellen exprimiert, welche nach 24 Stunden mit einem konfokalen Mikroskop untersucht wurden. Dabei wurden neben den einzelnen Varianten auch unterschiedliche Kombinationen von Fluoreszenzprotein-fusionierten und nicht fusionierten Kanalproteinen kotransfiziert, um Aufschlüsse über die Multimerisierungsverhältnisse zwischen den verschiedenen Proteinen zu erhalten. Zuerst wurden eYFP-fusionierte Versionen von TRPM6^{WT} bzw. TRPM7^{WT} exprimiert, um einen Überblick über die Oberflächenexpression der Wildtyp-Proteine zu erhalten.

Während das TRPM7^{WT}-Protein deutlich an der Oberfläche detektiert werden konnte, war dies beim TRPM6^{WT}-Protein nicht möglich (Abb. 3.14). YFP-getaggtetes TRPM6^{WT}-Protein konnte erst nach einer Koexpression mit ungetaggttem TRPM7^{WT}-Protein an der Oberfläche beobachtet werden (Abb. 3.14 A). Dies ist ein erneuter, deutlicher Hinweis darauf, dass TRPM6-Homomultimere nicht effizient an die Zelloberfläche gebracht werden und dass dieses Protein TRPM7 als Multimerisierungspartner benötigt, um zur Zellmembran zu gelangen und funktionelle Kanalkomplexe zu bilden.

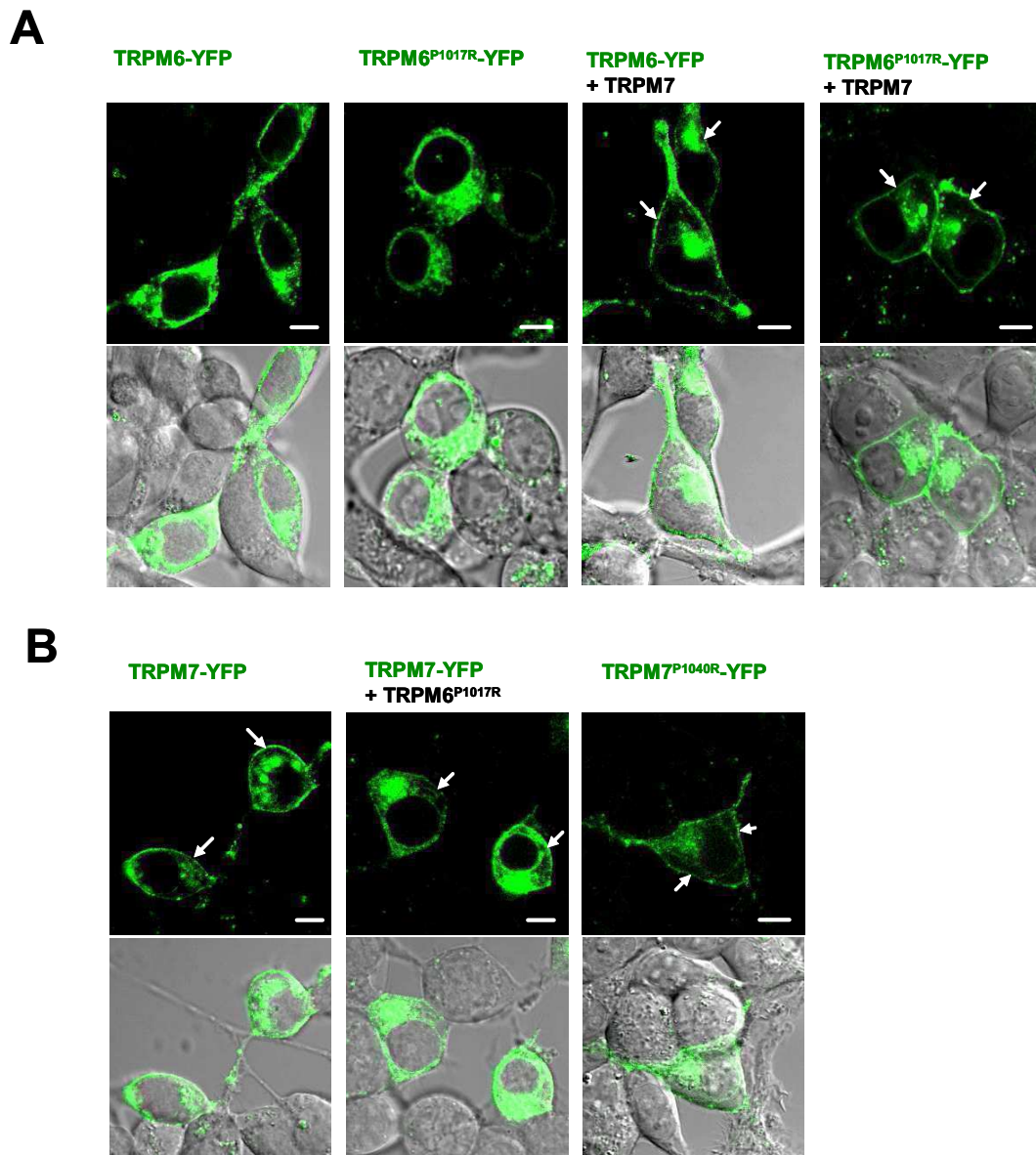


Abb. 3.14: Konfokale Aufnahmen von HEK293-Zellen nach transienter Expression von teilweise YFP-fusionierten Wildtyp- und mutanten Proteinen

A: Konfokale Aufnahmen (obere Reihe) und Differentiale Interferenzkontrast-Aufnahmen (untere Reihe) nach transienter Expression von TRPM6^{WT}-YFP- bzw. TRPM6^{P1016R}-YFP-Protein, sowie Koexpression von TRPM6^{WT}-YFP- und TRPM7^{WT}- bzw. TRPM6^{P1017R}- und TRPM7^{WT}-Protein; **B:** Transiente Expression von TRPM7^{WT}-YFP- bzw. TRPM7^{P1040R}-YFP-Protein, sowie Koexpression von TRPM7^{WT}-YFP- und TRPM6^{P1017R}-Protein; Weisse Pfeile markieren die Oberflächenexpression, die Balken entsprechen 5 µm

Des weiteren wurden die mutierten TRPM6- und TRPM7-Proteine alleine und, im Falle von TRPM6^{P1017R}, als Kotransfektion mit TRPM7^{WT} untersucht. Wie das Wildtyp-Protein wurde auch TRPM6^{P1017R} nicht an die Zelloberfläche gebracht (Abb. 3.14 A). Erst im Verbund mit TRPM7^{WT}-Protein konnte das eYFP-Signal an der Zelloberfläche lokalisiert werden. Im Gegensatz dazu konnte für TRPM7^{P1040R} auch bei alleiniger Transfektion eine Oberflächenexpression gezeigt werden,

vergleichbar mit der des TRPM7^{WT}-Proteins (Abb. 3.14 B). Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass die mutierten Proteine das gleiche Verhalten bezüglich der Oberflächenexpression aufweisen wie die Wildtyp-Proteine und dass ihre Fähigkeit, Homo- bzw. Heteromultimere zu bilden, nicht beeinträchtigt ist. Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Auswirkungen des Aminosäureaustausches P1017R im TRPM6-Protein, die bei Patienten mit dieser Mutation zur Ausprägung der HSH führen, nicht auf einem Multimerisierungs- oder Transportproblem beruhen, sondern auf einer verhinderten Kationenpermeation und somit einem vollständigem Funktionsverlust des TRPM6/7-Kanalkomplexes.

3.2 Funktionelle und phylogenetische Analyse von TRPM-Proteinen

3.2.1 Funktionelle Charakterisierung gezielter Mutationen im TRPM7

Um Einblick in die molekularen Hintergründe der Permeationseigenschaften des TRPM7-Kanals zu erhalten, wurden unter bestimmten Gesichtspunkten Mutationen im vermuteten Porenbereich des TRPM7-Proteins generiert. Geeignete Ziele schienen zum Beispiel aromatische Aminosäuren sowie solche mit negativ geladenen funktionellen Gruppen zu sein. Dabei beinhaltete der Ansatz, diese Aminosäuren in Richtung eines anderen, nahe verwandten Proteins zu mutieren, da hier am ehesten zu erwarten war, dass die Mutationen zu funktionellen Kanälen führen würden. Die Wahl fiel auf das TRPM2-Protein, da aufgrund seiner unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften mögliche Veränderungen im mutierten TRPM7-Kanal am einfachsten zu erkennen sein würden. Der TRPM2 ist ein sowohl für monovalente wie auch für divalente Kationen durchlässiger Kanal, der eine fast perfekt lineare Strom-Spannungs-Beziehung besitzt. Allein aufgrund dieser Eigenschaften stellt er ein offensichtliches Gegenstück zum TRPM7-Kanal mit seinem minimalen Einwärtsstrom sowie der fast nicht vorhandenen Monovalentenpermeabilität dar. Somit war der TRPM2-Kanal ein geeignetes Ziel, um die Auswirkungen gezielter Mutationen im TRPM7-Protein auf die Kationenpermeation des Kanals zu untersuchen.

Es wurden mittels zielgerichteter Mutationen im TRPM7-Protein sieben Konstrukte hergestellt, in denen jeweils eine Aminosäure in die korrespondierende Aminosäure des TRPM2-Proteins geändert wurde. Es wurden Aspartate und Glutamate wegen der negativ geladenen Seitenkette und Tyrosine aufgrund ihrer aromatische Gruppe

ausgewählt. Tryptophane beinhalten beide Eigenschaften und das Methionin im Bereich der mutmaßlichen Porenhelix schien interessant, da es in allen andern TRPM-Proteinen als Isoleucin konserviert ist. Die Abbildung 3.15 zeigt einen Aminosäuresequenzvergleich der putativen Porenregion mit Teilen der angrenzenden Transmembrandomänen, in denen die durchgeführten Aminosäureaustausche gekennzeichnet sind.

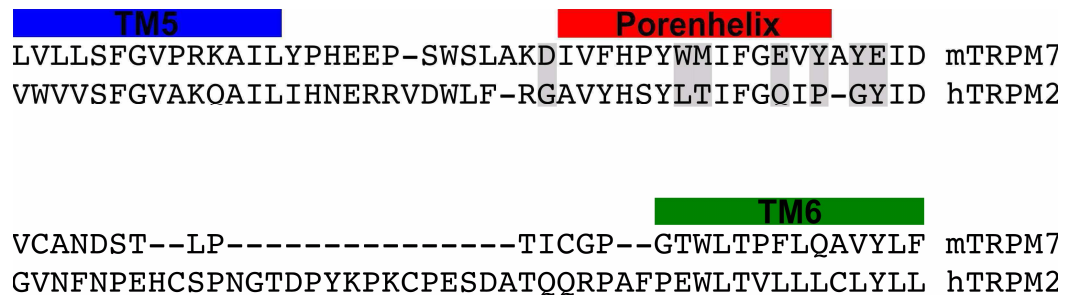


Abb. 3.15: Aminosäuresequenz-Vergleich der Porenregionen von mTRPM7- und hTRPM2-Proteinen mit Teilen der Transmembrandomäne fünf (TM5, blau) und sechs (TM6, grün) sowie der Porenhelix (rot). Die durchgeführten Aminosäureaustausche sind grau hinterlegt.

Zunächst werden sämtliche generierten Mutanten kurz charakterisiert, um danach genauer auf die Mutationen mit den deutlichsten Auswirkungen einzugehen.

Zu Beginn wurden für alle mutierten TRPM7-Kanäle, neben einer Analyse der Strom-Spannungs-Beziehung, die Umkehrpotentiale für eine physiologische Badlösung und verschiedene divalente Badlösungen bestimmt. Dies sollte einen initialen Eindruck davon geben, ob durch die Mutationen die Permeationseigenschaften des Kanals verändert waren.

3.2.1.1 Permeabilität des TRPM7-Kanals für monovalente Kationen

Die zur Untersuchung der Divalentenpermeation verwendeten Badlösungen sollten sich lediglich aus dem zu untersuchenden divalenten Kation als einzigen zweiwertigen Ladungsträger und einem weiteren, nicht permeablen einwertigen Ion zusammensetzen. Es ist bekannt, dass der TRPM7-Kanal in Abwesenheit divalenter Kationen auch monovalente Kationen wie zum Beispiel Natrium leitet (Nadler et al., 2001; Runnels et al., 2001), aber inwiefern dies auch unter physiologischen Bedingungen der Fall ist, ist noch nicht abschließend nachgewiesen. Im Gegensatz zu Natriumionen sind Cholin- sowie N-methyl-D-Glucamin-Kationen (NMDG⁺) große Kationen, für die in verschiedenen Studien gezeigt wurde, dass sie durch viele

Kanäle nicht permeieren können (Nadler et al., 2001; Launay et al., 2002; Story et al., 2003). Um festzustellen, für welches monovalente Kation der TRPM7-Kanal unter physiologischen Bedingungen am wenigsten durchlässig ist und welches somit die geeignete Basis für diese Lösung darstellte, wurde in der Badlösung ' Na^+ ' (145 mM NaCl, 2 mM CaCl, 1 mM MgCl, 10 mM HEPES, 10 mM Glukose) das Natriumchlorid durch NMDG-Chlorid bzw. Cholin-Chlorid ersetzt und die Höhe der Einwärtsströme bei den jeweiligen Lösungen analysiert (Abb. 3.16). Dabei wurden in jeder Messung die Einwärtsströme bei der ' NMDG^+ '- bzw. ' Cholin^+ '-Lösung auf die Einwärtsströme bei ' Na^+ ' normiert, um unterschiedliche Expressionsstärken zu berücksichtigen.

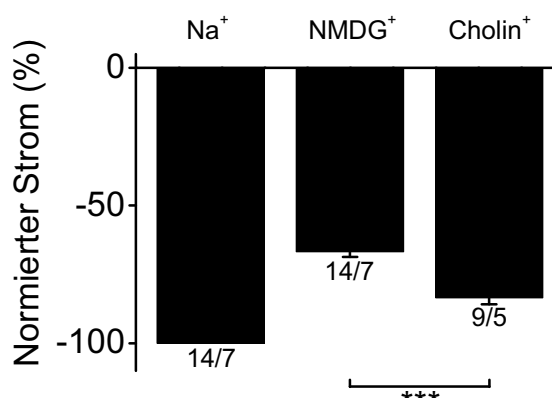


Abb. 3.16: Permeation verschiedener monovalenter Kationen durch den TRPM7^{WT}-Kanal. Einwärtsströme bei einem Haltepotential von -100 mV bei Lösungswechseln mit natriumbasierter Badlösung (Na^+) und Lösungen, in denen Natriumchlorid durch NMDG- (NMDG^+) oder Cholin-Chlorid (Cholin^+) ersetzt wurde, normiert auf den Strom unter Na^+ . Zahlen unter den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen und unabhängigen Transfektionen; *** = $p < 0,001$ (gepaarter T-Test)

Es zeigte sich, dass die in Ganzzellmessungen ermittelten TRPM7^{WT}-Ströme bei natriumhaltiger Lösung höher als die bei der Lösung mit Cholin und deutlich höher als die mit NMDG waren. Auch zwischen den relativen Strömhöhen bei ' Cholin^+ '- und ' NMDG^+ '-Lösung bestand ein höchst signifikanter Unterschied. Aufgrund der großen Differenz zwischen den Strömen bei ' Na^+ ' und ' NMDG^+ ' zeigte sich, dass der TRPM7-Kanal auch unter fast physiologischen Bedingungen in der Lage ist, Natriumionen zu leiten. Da unter nahezu physiologischen Divalentenkonzentrationen NMDG⁺ das am wenigsten permeable Kation ist, wurde in den folgenden Versuchen NMDG-Chlorid als Basis für die Lösungen verwendet.

3.2.1.2 Strom-Spannungs-Beziehungen und Divalentenpermeation

Bei der Analyse der Strom-Spannungs-Beziehungen der generierten Mutanten aus den üblichen Aufwärtssrampen von -100 bis +100 mV zeigte sich, dass für die physiologische Badlösung ' Na^+_{div} ' (140 mM NaCl, 5 mM CsCl, 2 mM CaCl, 1 mM MgCl, 10 mM HEPES, 10 mM Glukose) bei vier Mutanten - D1035G, W1042L, Y1051G und E1052Y - keine offensichtliche Veränderung der TRPM7-typischen Strom-Spannungs-Beziehung erkennbar war (Abb. 3.17). Bei zwei der Aminosäureaustausche, E1047Q und Y1049P, waren jedoch auffällige Änderungen in den Strom-Spannungs-Beziehungen zu beobachten. Bei beiden zeigte sich bei der Applikation der physiologischen Badlösung ein prominenter Einwärtsstrom, der in der Mutante TRPM7^{Y1049P} stärker ausgeprägt war als in TRPM7^{E1047Q}. In dem Glutamat zu Glutamin-Austausch zeigte sich zudem eine verringerte Stromzunahme bei Potentialen von etwa +10 bis +40 mV was auf eine veränderte Spannungsabhängigkeit in diesem Bereich zurückzuführen sein könnte. Im Tyrosin zu Prolin Austausch war dies nicht zu beobachten, hier fiel stattdessen auf, dass die TRPM7-typische Rektifizierung des Auswärtsstroms nicht mehr zu erkennen war. Die Strom-Spannungs-Beziehung dieser Mutante war bei positiven Potentialen nahezu linear.

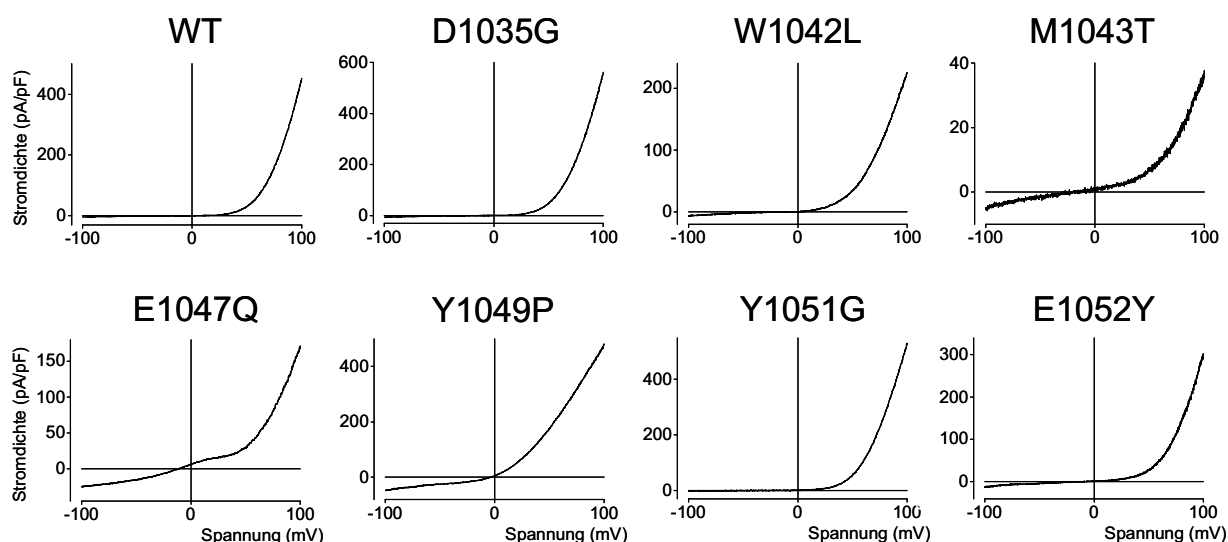
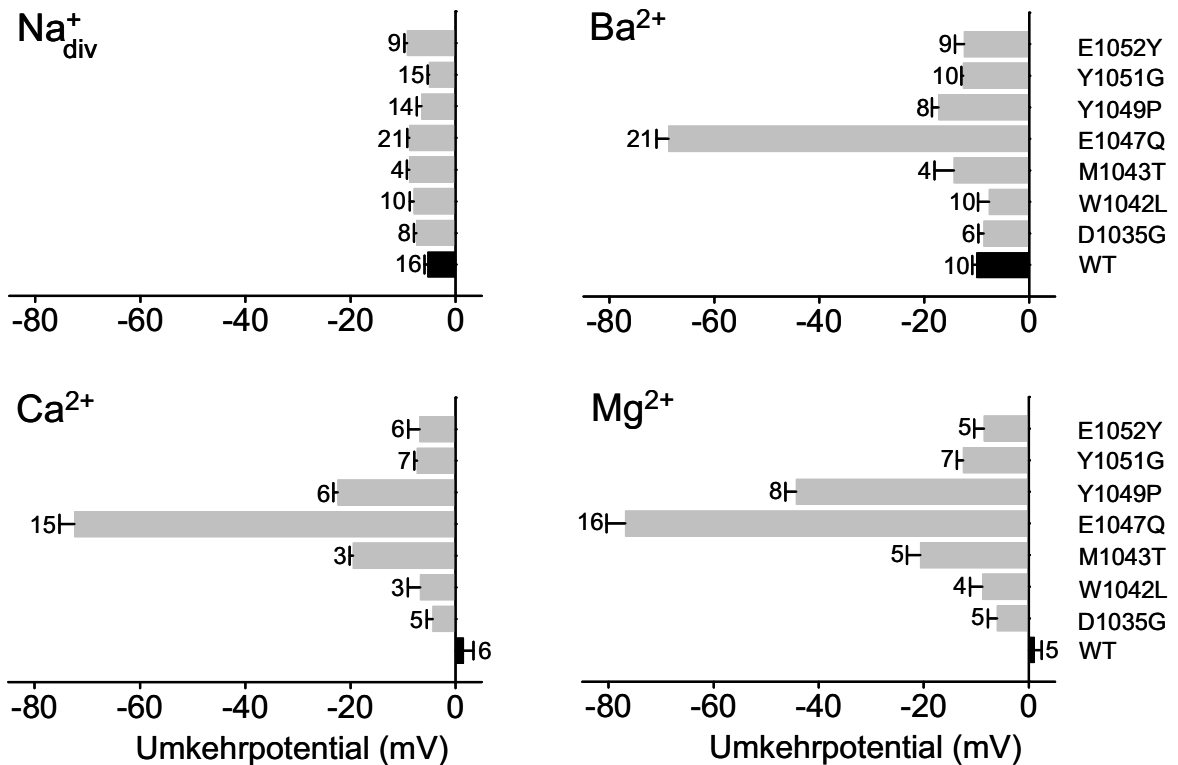


Abb. 3.17: Überblick über die Stromdichte-Spannungs-Beziehungen des TRPM7^{WT}-Kanal und der generierten Mutationen

Repräsentative Stromdichte-Spannungs-Beziehungen des TRPM7^{WT}-Kanals und der in Richtung des TRPM2-Proteins geänderten Mutanten bei einer Spannungsrampe von -100 bis +100 mV bei Applikation von physiologischer Badlösung (Na^+_{div}).

Eine deutliche Modulation der Strom-Spannungs-Beziehung des TRPM7-Kanals bewirkte auch die Mutation M1043T, die jedoch keine Stromentwicklung bewirken konnte. Hier schien die Kanalfunktion insgesamt stark beeinträchtigt zu sein.

A



B

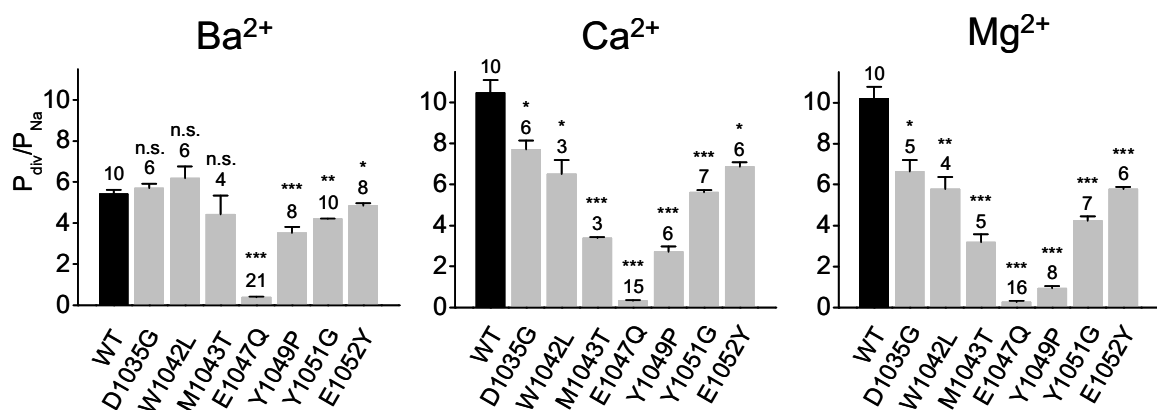
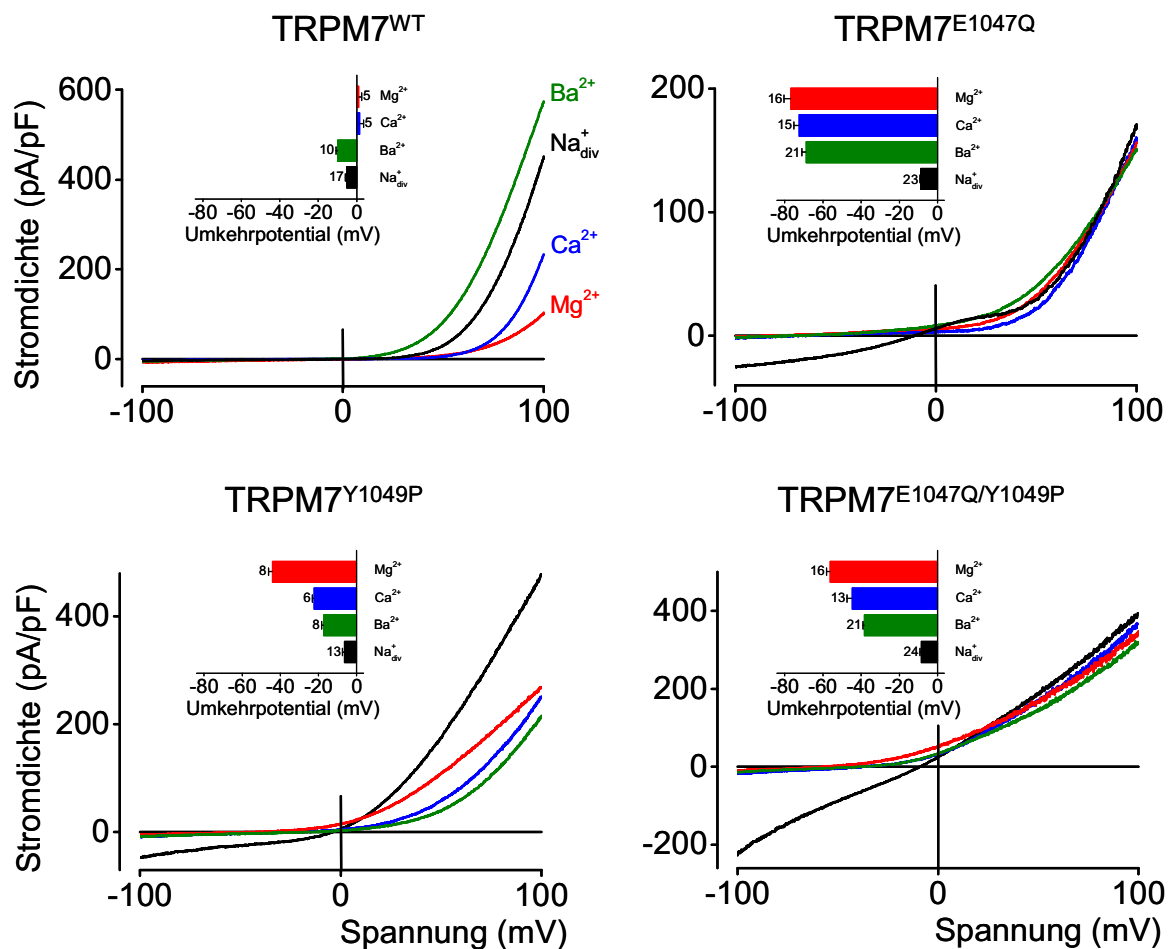
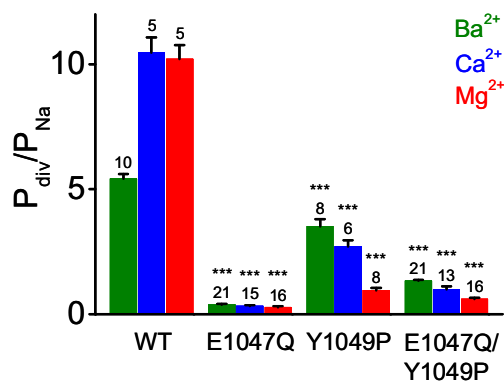


Abb. 3.18: Überblick über die Permeationseigenschaften der Mutationen im TRPM7-Kanal
A: Mittelwerte der Umkehrpotentiale des TRPM7^{WT} und der in Richtung TRPM2-Protein geänderten Mutanten bei Applikation von physiologischer Badlösung (Na^+_{div}), 10 mM Barium- (Ba^{2+}), 10 mM Calcium- (Ca^{2+}), oder 10 mM Magnesium-Lösung (Mg^{2+}); **B:** Aus den Umkehrpotentiale resultierende Permeabilitäten relativ zu Na^+ für die jeweilige Badlösung. Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen; * = < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; n.s. = nicht signifikant

Um zu überprüfen, ob und wie stark die gesetzten Mutationen Einfluß auf die Permeation von Divalenten durch den TRPM7-Kanal haben, wurden zunächst die Umkehrpotentiale der mutierten Kanäle bei den verschiedenen Divalentenlösungen im Vergleich zum Wildtyp analysiert (Abb. 3.18 A). Dies gibt einen direkten Hinweis auf die Permeabilität für das jeweilige Ion, da eine Annäherung an das Cäsium-Gleichgewichtspotential, das bei etwa -80 mV liegt, auf eine verminderte Permeation dieses Ions hindeutet. Die Badlösungen zur Untersuchung der Permeabilitäten setzen sich aus 150 mM NMDG-Chlorid und 10 mM von entweder Calciumchlorid (Ca^{2+}), Magnesiumchlorid (Mg^{2+}) oder Bariumchlorid (Ba^{2+}) zusammen. Für die physiologische Badlösung ' $\text{Na}^{+}_{\text{div}}$ ' lagen die Umkehrpotentiale beim TRPM7^{WT}-Kanal sowie bei allen Mutanten nahe Null. Dies ist bedingt durch die Zusammensetzung der Badlösung, die so konzipiert war, dass ein Kationenkanal bei einer angelegten Spannung von 0 mV (fast) keinen Strom leitet. Während die meisten der mutanten Kanäle genau wie der Wildtyp auch bei den drei Divalentenlösungen keine gravierenden Änderungen des Umkehrpotentials aufwiesen, zeigten die Aminosäureaustausche mit den veränderten Strom-Spannungs-Beziehungen, E1047Q und Y1049P, bei allen drei Badlösungen starke Verschiebungen der Umkehrpotentiale in Richtung negativer Potentiale. Das deutet darauf hin, dass in diesen Mutanten divalente Ionen nicht mehr oder nur noch in sehr geringem Maße fließen können. Eine Analyse der Permeabilitäten aus den ermittelten Umkehrpotentialen mithilfe einer modifizierten Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (s. Kapitel 2.4.3.1) bestätigte, dass in diesen Mutanten die Divalentenpermeation stark reduziert war, am stärksten die für Magnesiumionen. Im TRPM7^{E1047Q}-Kanal war die Divalentenpermeation für alle drei Ionen sogar nahezu eliminiert (Abb. 3.18 B). Die weiteren Versuche fokussierten auf diese beiden Mutationen, da in den restlichen Mutanten die Divalentenpermeation zwar verringert, aber noch deutlich erkennbar war. Lediglich der M1043T-Austausch wies für Calcium eine vergleichbare Einbuße in der Permeabilität auf wie TRPM7^{Y1049P}, allerdings kam sie aufgrund der eingeschränkten Kanalfunktion für die folgenden Untersuchungen nicht in Frage. Für die weitere Analyse wurde zusätzlich die Doppelmutante TRPM7^{E1047Q/Y1049P} generiert, um ihre Auswirkungen auf die Kanaleigenschaften zu beobachten.

A**B****Abb. 3.19:** Analyse der Aminosäureaustausche E1047Q und Y1049P im TRPM7-Protein

A: Repräsentative Stromdichte-Spannungs-Beziehungen mittels einer Spannungsrampe von -100 bis +100 mV des TRPM7^{WT} sowie der Aminosäureaustausche E1047Q und Y1049P und der Doppelmutante E1047Q/Y1049P bei Applikation von physiologischer Badlösung (Na⁺_{div}), 10 mM Barium- (Ba²⁺), 10 mM Calcium- (Ca²⁺), oder 10 mM Magnesium-Lösung (Mg²⁺). Eingeschobene Graphen zeigen die jeweiligen Mittelwerte der Umkehrpotentiale; **B:** Aus den Umkehrpotentialen errechnete Permeabilitäten relativ zur Permeabilität von Na⁺. Zahlen an den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen; *** = p < 0,001

In der Abbildung 3.19 sind Strom-Spannungs-Beziehungen, Umkehrpotentiale und Permeabilitäten für TRPM7^{WT} und jede der Mutanten zum Vergleich zusammengefasst. Die Stromdichten der Strom-Spannungs-Beziehungen geben dabei ungefähr die Stromhöhenverhältnisse bei Applikation der verschiedenen Badlösungen wieder, bis auf die Darstellung des TRPM7^{Y1049P}-Kanals sowie der Doppelmutante, da es hier starke Variationen im Verhältnis der Stromhöhen bei den verschiedenen Badlösungen gab. Bei der generierten Doppelmutante war, wie bei den beiden Einzelmутanten, ein deutlicher Einwärtsstrom zu erkennen, der den Eindruck erweckte, als würde er sich aus der Summe der Ströme der beiden Einzelmутanten ergeben. Die Strom-Spannungs-Beziehung erhält so eine auffällige Ähnlichkeit mit der fast linearen Strom-Spannungs-Beziehung des TRPM2-Kanals. Auch die Umkehrpotentiale und Permeabilitäten der Doppelmutante scheinen sich aus den beiden Einzelmутanten zu ergeben, sie liegen zwischen den entsprechenden Werten.

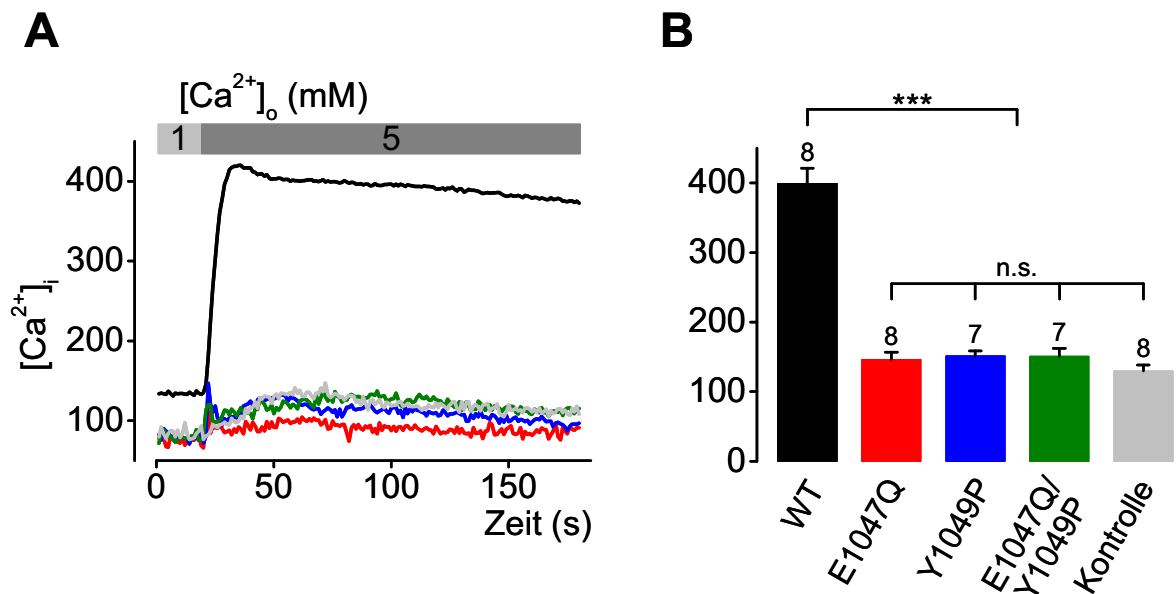


Abb. 3.20: Calciummessungen der Mutanten E1047Q, Y1049P und E1047Q/Y1049P im TRPM7-Protein mittels Aequorin-Biolumineszenz

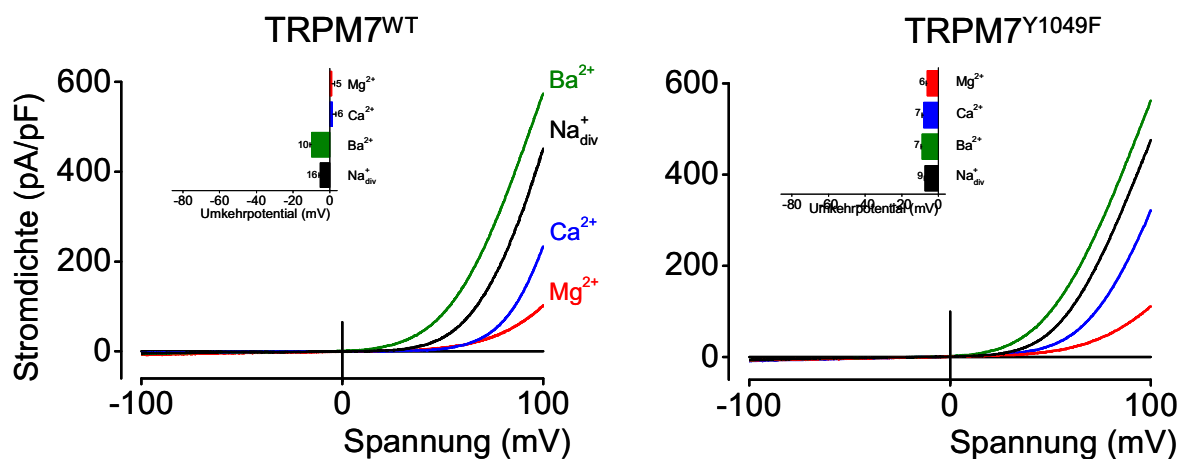
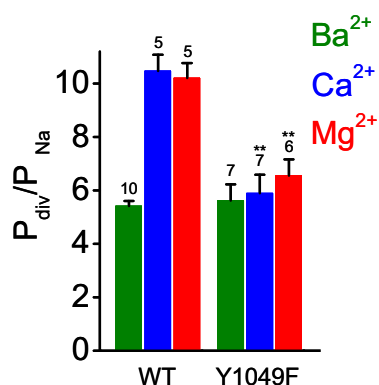
Exemplarische Calciumantworten auf einen Sprung in der extrazellulären Calciumkonzentration von 1 mM auf 5 mM, Jede Kurve entspricht der Antwort von 1×10^5 Zellen (links); entsprechende Mittelwerte der Calciumantworten für die angezeigten Expressionen 15 s nach Applikation von 5 mM Calciumlösung (rechts); als Kontrolle wurde der Leervektor pcDNA3.1 verwendet.

Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der unabhängigen Transfektionen; *** = $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant

Um diese Ergebnisse unter physiologischeren Bedingungen zu untersuchen, wurden Calciummessungen mithilfe von Aequorin durchgeführt. Diese Methode bietet den Vorteil, dass das Zellinnere nicht verändert wird und somit intrazellulär physiologische Bedingungen herrschen. Durch einen Sprung in der extrazellulären Calciumkonzentration von 1 mM auf 5 mM während der Messung kam es zu einem Calciumeinstrom durch die Kanäle. Durch Ermittlung des gesamten in der Zelle exprimierten Aequorins konnte die absolute Calciummenge kalkuliert werden (s. Kapitel 2.4.2). Im Vergleich der verschiedenen Mutanten mit dem Wildtyp zeigte sich deutlich, dass bei Analyse der Calciumantwort 15 s nach Applikation der Calciumlösung bei beiden Einzelmутanten sowie der Doppelmutante kein relevanter Calciumeinstrom zu beobachten war. Im Gegensatz dazu zeigte der Wildtyp einen großen Influx von Calcium (Abb. 3.20). Diese Ergebnisse sind ein deutlicher Beleg dafür, dass die Mutationen fast nicht mehr in der Lage sind, Calcium zu leiten.

3.2.1.3 Verschiedenen Glutamat- und Tyrosinmutationen

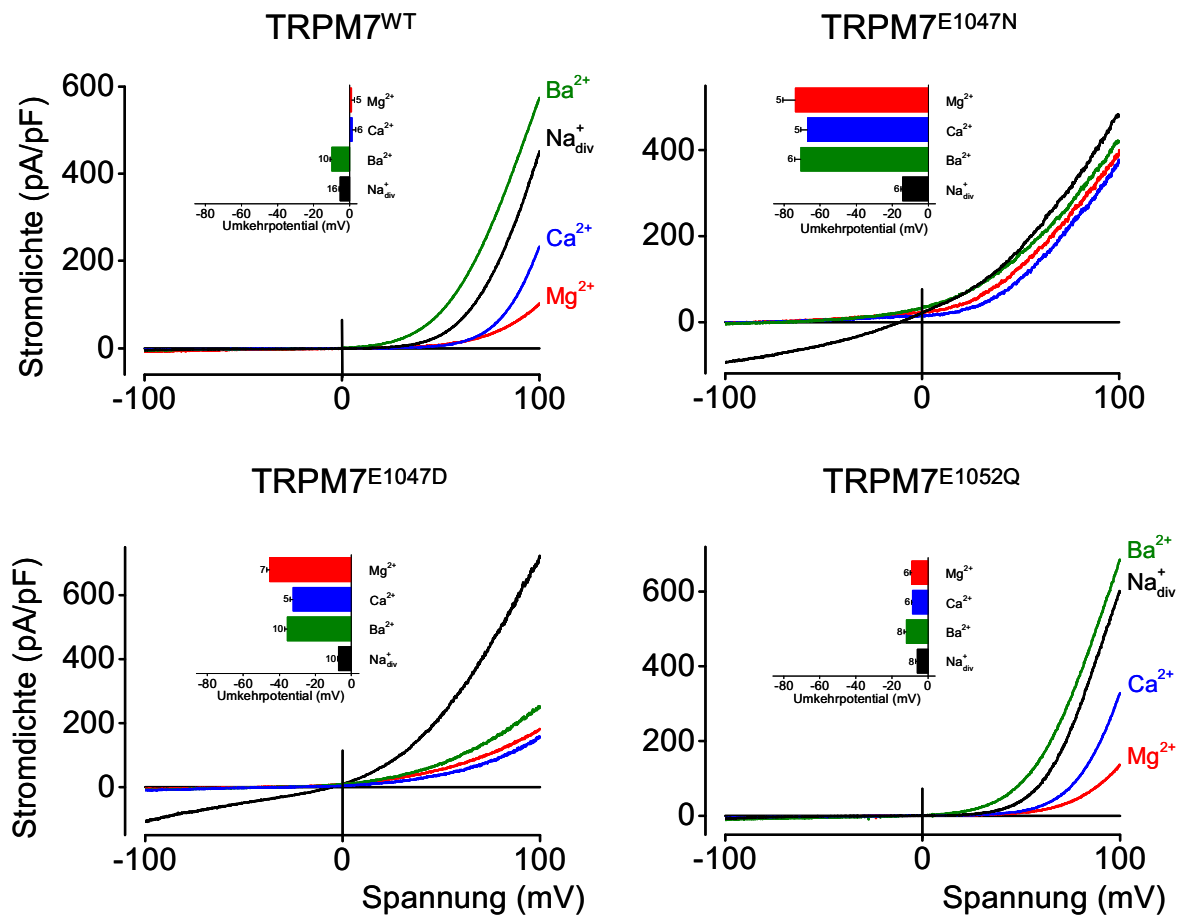
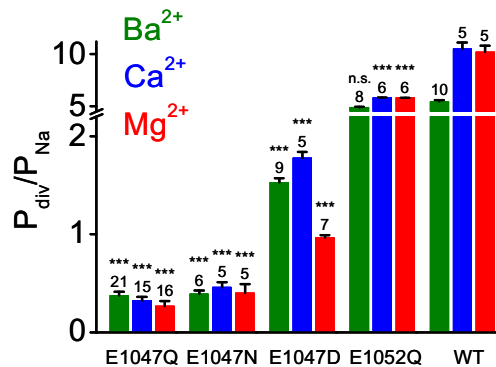
Im Folgenden wurden das Tyrosin 1049 und die Glutamate in der Porenregion an den Positionen 1047 und 1052 genauer untersucht. Dabei wurde das Tyrosin 1049 durch Phenylalanin ersetzt, welches an der entsprechenden Position auch im TRPM1- und TRPM3-Protein zu finden ist und dem die Hydroxylgruppe des Tyrosins fehlt. Es wurden wiederum zunächst die Strom-Spannungs-Beziehungen sowie die Umkehrpotentiale und Permeabilitäten des TRPM7^{Y1049F} für die verschiedenen divalenten Lösungen analysiert und mit denen des TRPM7^{WT}-Kanals verglichen. Hier zeigte sich, dass weder in Bezug auf die Strom-Spannungs-Beziehung noch auf die Permeabilitäten ein gravierender Unterschied zum Wildtyp festzustellen war (Abb. 3.21). Die funktionelle Gruppe des Tyrosins ist somit nicht verantwortlich für den Einfluss der Aminosäure auf die Permeationseigenschaften des Kanals, der bestimmende Faktor scheint hier der aromatische Ring zu sein.

A**B****Abb. 3.21:** Analyse des Aminosäureaustausches Y1049F im TRPM7-Protein

A: Repräsentative Stromdichte-Spannungs-Beziehungen mittels einer Spannungsrampe von -100 bis +100 mV des TRPM7^{WT} sowie des Aminosäureaustausches Y1049F bei Applikation von physiologischer Badlösung (Na^+), 10 mM Barium- (Ba^{2+}), 10 mM Calcium- (Ca^{2+}) oder 10 mM Magnesium-Lösung (Mg^{2+}). Eingeschobene Graphen zeigen die jeweiligen Mittelwerte der Umkehrpotentiale; **B:** Aus den Umkehrpotentialen errechnete Permeabilitäten relativ zur Permeabilität von Na^+ .

Zahlen an den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen; ** = $p < 0,01$; n.s. = nicht signifikant

Des weiteren wurde das Glutamat an der Position 1052 ebenfalls durch ein Glutamin ersetzt, um zu überprüfen, ob auch dieses eine zentrale Rolle für die Permeationseigenschaften des Kanals spielt. Zudem wurde statt des Glutamats an der Position 1047 ein Aspartat bzw. Asparagin eingefügt, um zu beurteilen, ob lediglich die negative Ladung an dieser Position oder auch die Länge der Seitenketten und somit die Entfernung der funktionellen Gruppen vom Porencentrum das Kriterium für die Divalentenpermeation ist.

A**B****Abb. 3.22:** Analyse der Aminosäureaustausche E1047D, E1047N und E1052Q

A: Repräsentative Stromdichte-Spannungs-Beziehungen bei einer Spannungsrampe von -100 bis +100 mV des TRPM7^{WT} sowie der Aminosäureaustausche E1047D, E1047N und E1052Q bei Applikation von physiologischer Badlösung (Na⁺_{div}), 10 mM Barium- (Ba²⁺), 10 mM Calcium- (Ca²⁺), oder 10 mM Magnesium-Lösung (Mg²⁺). Eingeschobene Graphen zeigen die jeweiligen Mittelwerte der Umkehrpotentiale; **B:** Aus den Umkehrpotentialen errechnete Permeabilitäten relativ zur Permeabilität von Na⁺.

Zahlen an den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen; *** = p < 0,001

Bei der Analyse der Strom-Spannungs-Beziehungen wurde deutlich, dass die der Mutante TRPM7^{E1047N} sehr der des TRPM7^{E1047Q}-Kanals ähnelte, mit prominentem

Einwärtsstrom und einer schwächeren Steigung im Bereich von +10 bis +40 mV. Die Mutation TRPM7^{E1047D} zeigte zwar deutliche Einwärtsströme bei negativen Potentialen, allerdings waren diese kleiner als in der TRPM7^{E1047N} und der Auswärtsstrom ähnelte eher dem Wildtyp. In der Mutation des zweiten Glutamats an Position 1052 zu Glutamin war kein Unterschied in der Strom-Spannungs-Beziehung im Vergleich zum Wildtyp bemerkbar (Abb. 3.22 A). Auch bezüglich der Umkehrpotentiale bei den verschiedenen Divalenten-Badlösungen und somit Permeabilitäten konnte in der TRPM7^{E1052Q}-Mutante nur geringe Verschiebungen im Vergleich zum TRPM7^{WT} beobachtet werden. Bei dem TRPM7^{E1047D}-Kanal waren stärkere Verschiebungen zu beobachten, was darauf hindeutet, dass auch die Entfernung der funktionellen Gruppen zum Zentrum der Pore eine Rolle spielt. Am stärksten waren die Auswirkungen aber bei dem Glutamat zu Asparagin Austausch, die Permeabilitäten erreichten mit $0,39 \pm 0,04$; $0,46 \pm 0,05$ und $0,40 \pm 0,09$ für Barium-, Calcium- bzw. Magnesiumionen fast die des Glutaminaustausches ($0,37 \pm 0,04$; $0,32 \pm 0,04$ und $0,27 \pm 0,05$). Auch hier fand also nahezu keine Divalentenpermeation mehr statt (Abb. 3.22 B).

Auch diese mutierten Kanäle wurden zusammen mit dem TRPM7^{WT} in Äquorin-basierten Calciummessungen untersucht, wobei wieder der pcDNA-Leervektor als Vergleich diente. Die Ergebnisse spiegeln die Verhältnisse bei den Permeabilitäten wieder, so war beim Asparagin-Austausch keine Calciumantwort zu erkennen, die gemessenen Calciumkonzentrationen unterschieden sich nicht signifikant von denen des Leervektors. Die TRPM7^{E1047D}-Mutante dagegen zeigte einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, die aber hoch signifikant geringer war als die des Wildtyps. Der Calciumantwort beim Austausch des zweiten Glutamats der Pore, E1052Q, erreichte fast die Höhe des Wildtyps, blieb aber noch signifikant darunter (Abb. 3.23). Zusammenfassend zeigte sich auch hier, dass die Eliminierung des negativen Aminosäurerestes an der Position 1047 die stärksten Auswirkungen brachte. Im Gegensatz zu den anderen Mutanten, in denen noch deutliche Calciumantworten zu erkennen waren, war beim TRPM7^{E1047N}-Kanal keine signifikante Erhöhung des Calciuminfluxes zu beobachten. Die Erhöhung der Entfernung zwischen der negativ geladenen Seitenkette und dem Porenzentrum hatte geringere Auswirkungen, der durch TRPM7^{E1047D} gebildete Kanal zeigte nur schwache Veränderungen der Strom-Spannungs-Beziehungen und Permeabilitäten und war in der Lage, in Äquorinmessungen eine deutliche Stromantwort zu generieren. Die

negative Ladung an Position 1047 scheint also eine essentielle Rolle für die Calcium- und vermutlich die gesamte Divalentenpermeation zu spielen.

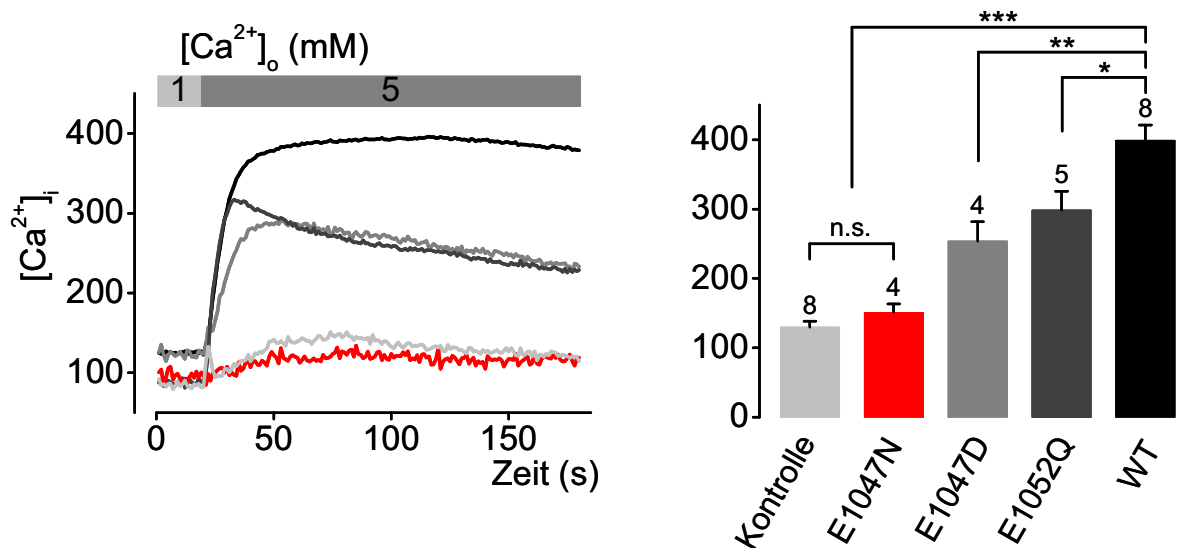


Abb. 3.23: Calciummessungen der Mutanten E1047N, E1047D und E1052Q im TRPM7-Protein mittels Aequorin-Biolumineszenz

Exemplarische Calciumantworten auf einen Sprung in der extrazellulären Calciumkonzentration von 1 mM auf 5 mM, Jede Kurve entspricht der Antwort von 1×10^5 Zellen (links); Entsprechende Mittelwerte der Calciumantworten für die angezeigten Expressionen 15 s nach Applikation von 5 mM Calciumlösung (rechts); als Kontrolle wurde der Leervektor pcDNA3.1 verwendet.

Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der unabhängigen Transfektionen; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; n.s. = nicht signifikant

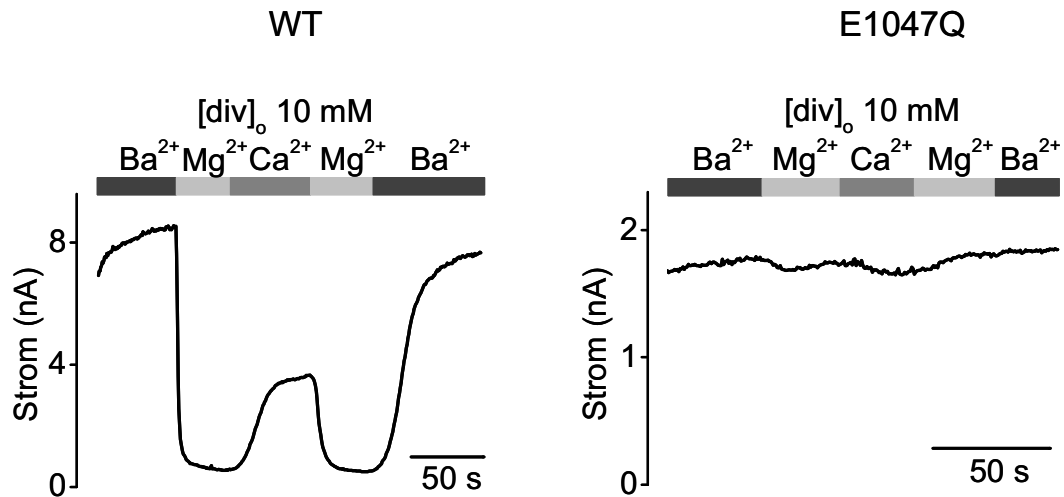
3.2.1.4 Block des TRPM7-Kanals durch intra- und extrazelluläre divalente Kationen

Eine typisches Charakteristikum des TRPM7-Kanals ist ein intrinsischer Block der Kanalaktivität durch intra- und auch extrazelluläre Magnesiumionen. Aber auch Calciumionen sind in der Lage, diese Inhibierung des Kanals auszulösen. Detektieren lässt er sich am einfachsten durch Analyse der Auswärtsströme bei Applikation von unterschiedlich hoch konzentrierten Divalentenlösungen.

So wurden im folgenden Versuch bei den *patch clamp*-Messungen die schon beschriebenen NMDG-basierten 10 mM Divalentenlösungen appliziert und die Ströme bei einem Haltepotential von +100 mV verglichen. Dabei wurde auf die E1047Q-Mutante im Vergleich zum Wildtyp fokussiert, da hier im Hinblick auf die Permeabilitäten die gravierendsten Effekte zu beobachten waren. Während der Messungen stellte sich heraus, dass mit der 10 mM Bariumlösung die höchsten

Ströme in den Zellen induziert wurden, auch im Vergleich zu denen bei physiologischer Badlösung. Das ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass die physiologische Badlösung 1 mM Magnesium und 2 mM Calcium enthält, weswegen auch diese Lösung schon einen Block des Kanals bewirkt. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass extrazelluläres Barium die Auswärtsströme durch den TRPM7-Kanal erhöht (Monteilh-Zoller et al., 2003).

A



B

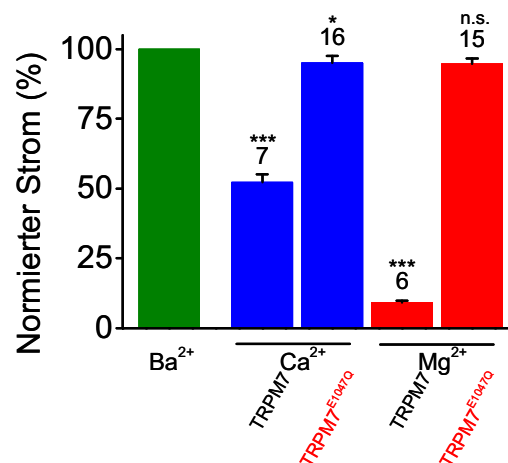


Abb. 3.24: Blockade des TRPM7^{WT}-Kanals und des Aminosäureaustausches E1047Q durch extrazelluläre divalente Kationen

A: Exemplarische Strom-Zeitverläufe bei einem Haltepotential von +100 mV für TRPM7^{WT} und TRPM7^{E1047Q} bei Applikation von 10 mM Barium- (Ba^{2+}), Calcium- (Ca^{2+}), oder Magnesium-Lösung (Mg^{2+}); **B:** Entsprechende Mittelwerte der Stromantworten, normiert auf die Bariumantwort.

Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$ (gepaarter T-Test)

Deswegen wurden im Folgenden die Bariumströme jeder Messung als 100% angegeben und die Effekte durch die 10 mM Calcium bzw. Magnesium-Lösung relativ dazu bewertet. Für den TRPM7^{WT}-Kanal ergab sich eine Verminderung der Cäsium-Auswärtsströme auf etwa 50% durch Calcium- und fast 90% durch Magnesiumionen. Im Vergleich dazu konnte keine der Badlösungen eine starke Stromabnahme bei der Glutamat-zu-Glutamin-Mutante bewirken. Bei beiden Lösungen blieb noch etwa 95% des Auswärtsstroms erhalten (Abb. 3.24 B).

Nach diesen Hinweisen auf einen gestörten Block im TRPM7^{E1047Q}-Kanal wurde der Einfluss von extrazellulärem Magnesium auf die Aktivität des Wildtyp- sowie des mutanten Kanals genauer untersucht. Dazu wurden natriumbasierte Badlösungen appliziert, die verschiedene Magnesiumkonzentrationen von 1 μ M bis 20 mM enthielten. Sich dadurch ergebende Schwankungen in der Osmolarität der Lösungen wurden durch Zugabe von Mannitol ausgeglichen. Anschließend wurde für beide Kanäle ein Wert für die Magnesium-Konzentration bei halbmaximaler Inhibierung (IC_{50}) durch Erstellen einer Sättigungskurve mithilfe der Hill-Gleichung ermittelt. Die Abbildung 3.25 A zeigt exemplarische Strom-Zeitverläufe bei einem Haltepotential von +100 mV für diese Messungen, bei denen sich bereits zeigt, dass die Mutante TRPM7^{E1047Q} auch bei hohen Magnesiumkonzentrationen praktisch keinen Stromverlust aufweist. Die dazugehörigen Sättigungskurven (Abb. 3.25 B) zeigen, dass bei Applikation von 20 mM Magnesiumlösung in der Mutante fast kein Stromverlust zu beobachten und somit keine Bestimmung des IC_{50} -Wertes möglich war, während es im Wildtyp zu einem fast vollständigen Block mit einem IC_{50} -Wert von $0,8 \pm 0,1$ mM kam. Zum Vergleich wurden auch noch die IC_{50} -Werte der anderen Glutamat-Mutanten (E1047D, E1047N und E1052Q) bestimmt. Übereinstimmend mit den vorherigen Untersuchungen zeigte sich, dass auch in der TRPM7^{E1047N}-Mutante keine Stromreduzierung festgestellt werden konnte. Die Mutanten TRPM7^{E1052Q} und TRPM7^{E1047D} bildeten noch einen vollständigen bzw. fast vollständigen Block mit IC_{50} -Werten von $2,8 \pm 0,2$ und $1,2 \pm 0,1$ mM aus, auffällig war allerdings, dass sich für E1047D und noch stärker für E1052Q ein rechtsverschobener Kurvenverlauf ergab.

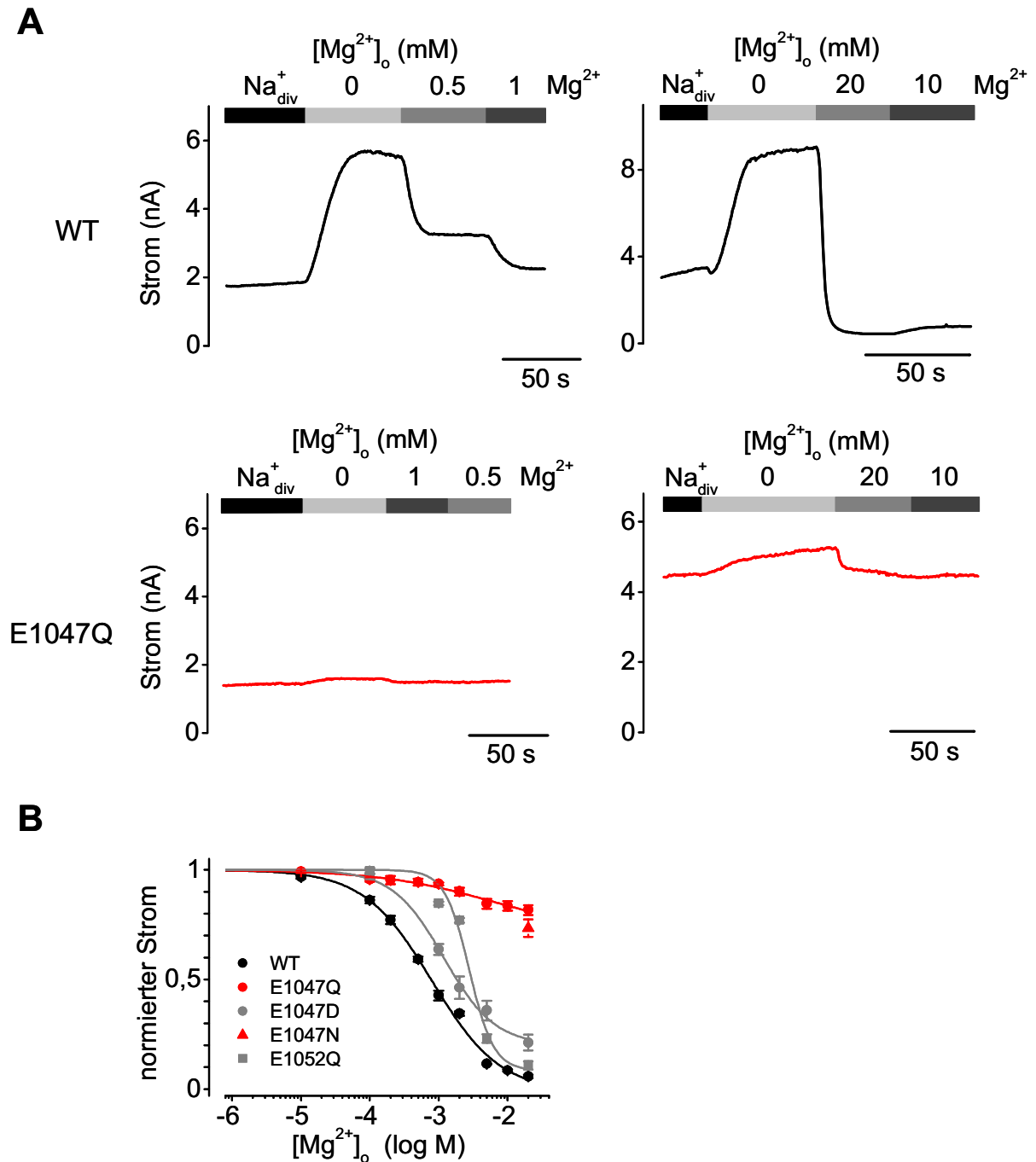


Abb. 3.25: Block des TRPM7^{WT}-Kanals und der Aminosäureaustausche an Position 1047 und 1052 durch extrazelluläre Magnesiumionen

A: Exemplarische Strom-Zeitverläufe bei einem Haltepotential von +100 mV für TRPM7^{WT} und TRPM7^{E1047Q} bei Applikation natriumbasierter Badlösungen mit verschiedenen Magnesiumkonzentrationen; **B:** Normierte Stromhöhen bei den verschiedenen Lösungen für die angegebenen Expressionen und ermittelte Ausgleichskurven mittels der Hill-Gleichung. Jeder Datenpunkt entspricht 3-14 Messungen aus mindestens 3 unabhängigen Transfektionen

Bei Betrachtung der gewonnenen Sättigungskurven (Abb. 3.26 B) ist zu erkennen, dass sie nahezu deckungsgleich sind. Auch die IC_{50} -Werte sind mit $0,35 \pm 0,03$ und $0,33 \pm 0,02$ mM für TRPM7^{WT} bzw. TRPM7^{E1047Q} fast identisch. Das Glutamat an Position 1047 scheint also nicht die Bindungsstelle für intrazelluläre Magnesiumionen zu sein sondern ist nur durch extrazelluläre Magnesiumionen erreichbar.

Da aber sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante der Mittelwert bei einer intrazellulären Magnesiumkonzentration von 500 μ M deutlich aus der Ausgleichskurve herausfällt, wurde exemplarisch für den TRPM7^{WT}-Kanal versucht, durch die Verwendung weiterer Magnesiumkonzentrationen von 700 μ M, 1,5 mM und 2 mM Aufschluss über das Verhalten des Kanals in diesem Bereich zu erhalten. Dabei zeigte sich, dass der Datenpunkt bei 500 μ M kein zufällig abweichender Wert ist, sondern dass ein Plateau bei den Konzentrationen von 0,5 bis 1 mM zu finden ist. Eine Neuerstellung der Ausgleichskurve ergab eine weitere niederaffine Bindungsstelle mit einem IC_{50} -Wert von $1,47 \pm 0,03$ mM. Der Wert für die anfänglich gefundene Bindungsstelle verschob sich durch die erneute Berechnung nur minimal zu einem IC_{50} -Wert von $0,31 \pm 0,01$ mM (Abb. 3.26 C).

Zusammenfassend zeigt sich also, dass nur das Entfernen der negativen Gruppe an der Position 1047 zu einem fast vollständigen Verlust des Blocks durch extrazelluläre Magnesiumionen führte, der Block durch intrazelluläre Magnesiumionen ist dadurch nicht beeinträchtigt. Zudem zeigen sich Hinweise darauf, dass es im TRPM7-Kanal zwei intrazelluläre Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität gibt.

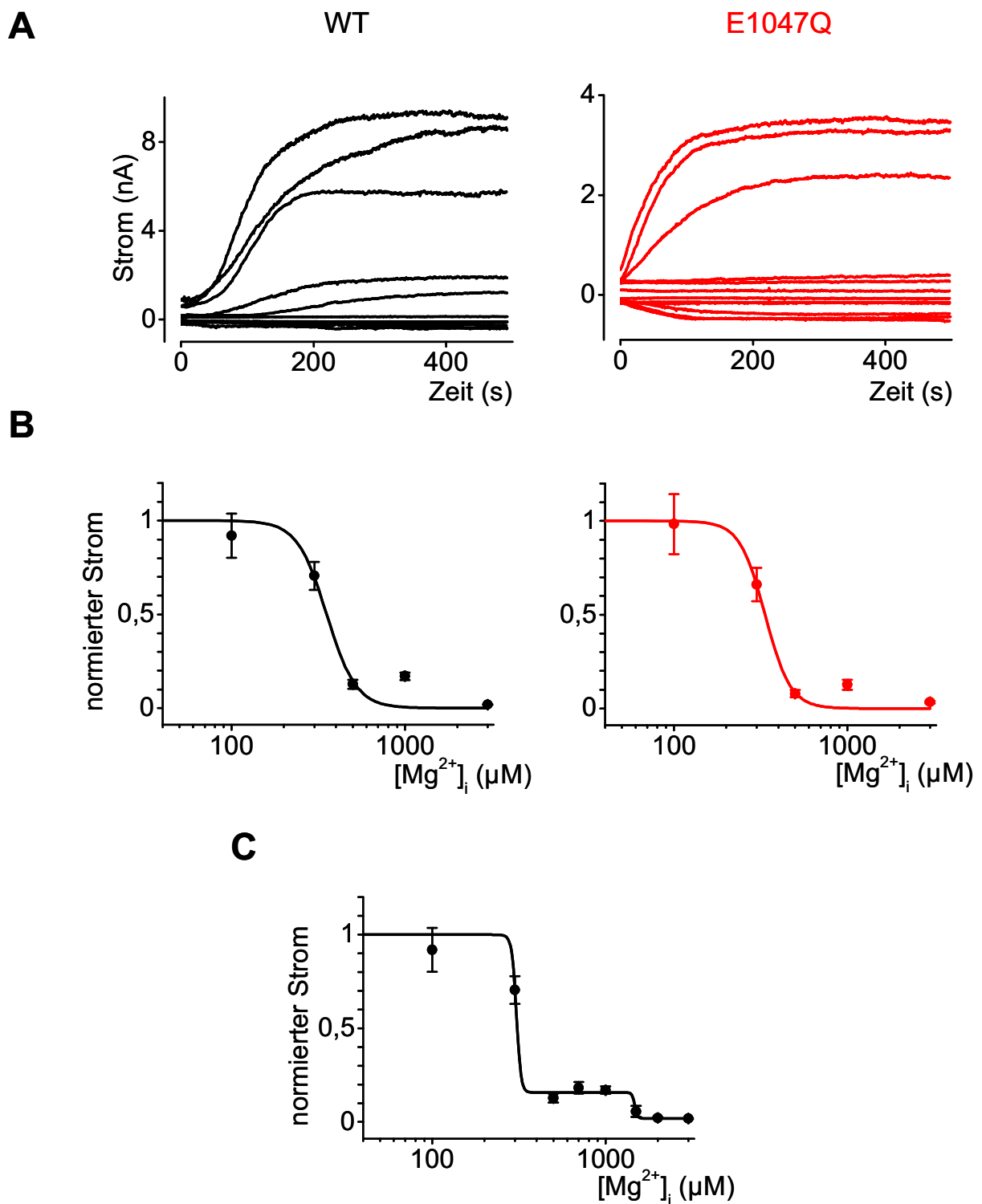


Abb.3.26: Block des TRPM7^{WT}-Kanals und der Aminosäureaustausche an Position 1047 und 1052 durch extrazelluläre Magnesiumionen

A: Exemplarische Strom-Zeitverläufe bei einem Haltepotential von +100 mV und -100 mV für TRPM7^{WT} und TRPM7^{E1047Q} bei Verwendung verschiedener intrazellulärer Magnesiumkonzentrationen; **B:** Normierte Werte der Stromreduktion bei den verschiedenen Lösungen und ermittelte Ausgleichskurven mittels der Hill-Gleichung; **C:** Normierte Werte der Stromreduktion nach Applikation zusätzlicher Magnesiumkonzentrationen und ermittelte Ausgleichskurven mittels der Hill-Gleichung.

Jeder Datenpunkt entspricht 9-51 Messungen aus mindestens 3 unabhängigen Transfektionen

3.2.1.5 Transienter Einwärtseffekt durch Magnesium

Bei Messungen des TRPM7^{WT}-Kanals kommt es beim Wechsel von physiologischer Badlösung (Na^+_{div}) zu 10 mM Magnesiumlösung (Mg^{2+}) zu einem transienten Einstrom von Magnesiumionen. Im folgenden wurde untersucht, ob sich dieser Effekt bei TRPM7^{E10147Q}- und TRPM7^{WT}-Kanal unterscheidet.

Dazu sollte vor der Applikation der Magnesiumlösung eine Lösung appliziert werden, deren Bestandteile nicht oder kaum durch den TRPM7-Kanal permeieren, um die Einwärtsströme so weit als möglich zu eliminieren und den Effekt besser beurteilen zu können. Die Wahl fiel dabei auf eine reine NMDG-Lösung, für dieses monovalente Kation war bereits in Vorversuchen (s. Kapitel 3.2.1.1) gezeigt worden, dass es nur in sehr geringem Maße durch den TRPM7-Kanal permeieren kann.

Zunächst sollte aber noch gesichert werden, dass die Mutante TRPM7^{E1047Q} kein anderes Permeationsverhalten in Bezug auf dieses Ion aufweist, deswegen wurde auch diese Mutante unter Verwendung der physiologischen Badlösung ' Na^+ ' sowie ihren NMDG- und Cholin-Varianten (NMDG^+ , Cholin^+) analysiert und mit den Ergebnissen zum Wildtyp verglichen. Allerdings weist die Mutante einen stark erhöhten Einwärtsstrom bei der natriumhaltigen Lösung ' Na^+_{div} ' auf. Da zur Berücksichtigung von Expressionsunterschieden eine Normierung auf den Strom bei Natriumlösung erfolgte, waren die Ergebnisse zwischen TRPM7^{WT} und TRPM7^{E1047Q} nicht vergleichbar. Aufgrund dessen wurden zusätzlich die Leitfähigkeiten als Steigung im Bereich von -75 bis -85 mV mittels einer linearen Regression der Strom-Spannungs-Beziehungen bestimmt (s. Kapitel 2.4.3.1).

Für den Wildtyp bestätigten die Leitfähigkeiten die Ergebnisse aus dem Vergleich der Stromdichten: Natrium kann am besten geleitet werden, gefolgt von Cholin^+ und NMDG^+ . Bei der Mutante TRPM7^{E1047Q} waren Stromdichte sowie Leitfähigkeit bei der natriumhaltigen Lösung erwartungsgemäß deutlich erhöht. Auffälligerweise war diese Mutante kaum durchlässig für NMDG- und Cholin-Ionen, was deutlich zeigt, dass der aus TRPM7^{E1047Q} gebildete Kanal immer noch zwischen verschiedenen Ionen unterscheidet und somit eine selektive Pore besitzt (Abb. 3.27 B). Die Leitfähigkeiten der TRPM7^{E1047Q}-Mutante bei Cholin- und NMDG-Lösung sind kaum höher als die des Wildtyp, wobei die Mutante keins der beiden Ionen präferiert. Allerdings leitet der TRPM7^{WT}-Kanal NMDG-Ionen deutlich schlechter als Cholin-Ionen, somit wurde für die folgenden Versuche NMDG-Chlorid für die divalentenfreie Badlösung eingesetzt.

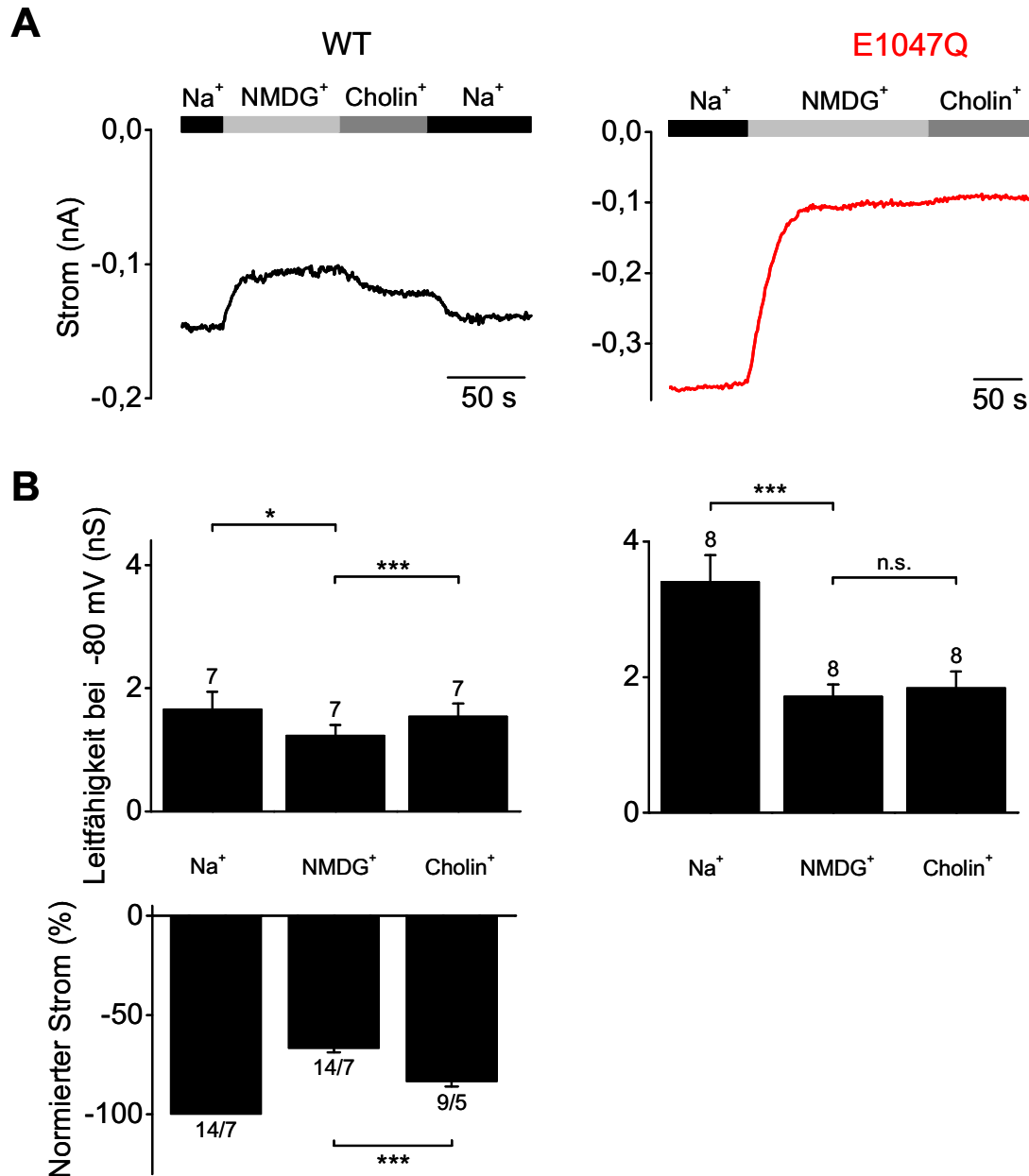


Abb. 3.27: Selektivität von TRPM7^{WT} und TRPM7^{E1047Q} für monovalente Kationen

A: Exemplarische Strom-Zeitverläufe bei einem Haltepotential von -100 mV für TRPM7^{WT} und TRPM7^{E1047Q} bei Lösungswechseln mit natriumbasierter Badlösung (Na⁺) und Lösungen, in denen Natrium durch NMDG-Chlorid (NMDG⁺) oder Cholin (Cholin⁺) ersetzt wurde; **B:** Leitfähigkeiten für die verschiedenen Lösungen bei -80 mV (obere Abbildungen) und durchschnittliche Einwärtsströme bei -100 mV, normiert auf den Strom unter Na⁺_{div} (untere Abbildungen).

Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen und unabhängigen Transfektionen; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant (gepaarter T-Test)

Um die Höhe der transienten Einwärtsströme der TRPM7^{WT}- und TRPM7^{E1047Q}-Kanäle zu ermitteln, wurde vor der Applikation der Magnesiumlösung eine isotonen NMDG-Lösung (NMDG⁺_{high}) mit 150 mM NMDG-Chlorid und 25 mM Mannitol appliziert, um die Einwärtsströme so weit als möglich zu eliminieren und den Effekt

der Magnesiumapplikation besser beurteilen zu können (Abb. 3.28 A). Dabei zeigte sich, dass bei der Applikation dieser NMDG-Lösung nach kurzer Zeit Leckströme auftraten, deswegen wurde nicht das vollständige Verschwinden des Einwärtsstroms abgewartet. Trotzdem war der Effekt durch die weitgehende Reduktion der Einwärtsströme deutlich zu beobachten. Die isotone Magnesiumlösung ($\text{Mg}^{2+}_{\text{high}}$) bestand aus 100 mM Magnesium und 50 mM Mannitol. Der unter der NMDG-Lösung auftretende Reststrom wurde auf 100% normiert und die Einwärtseffekte relativ dazu bewertet.

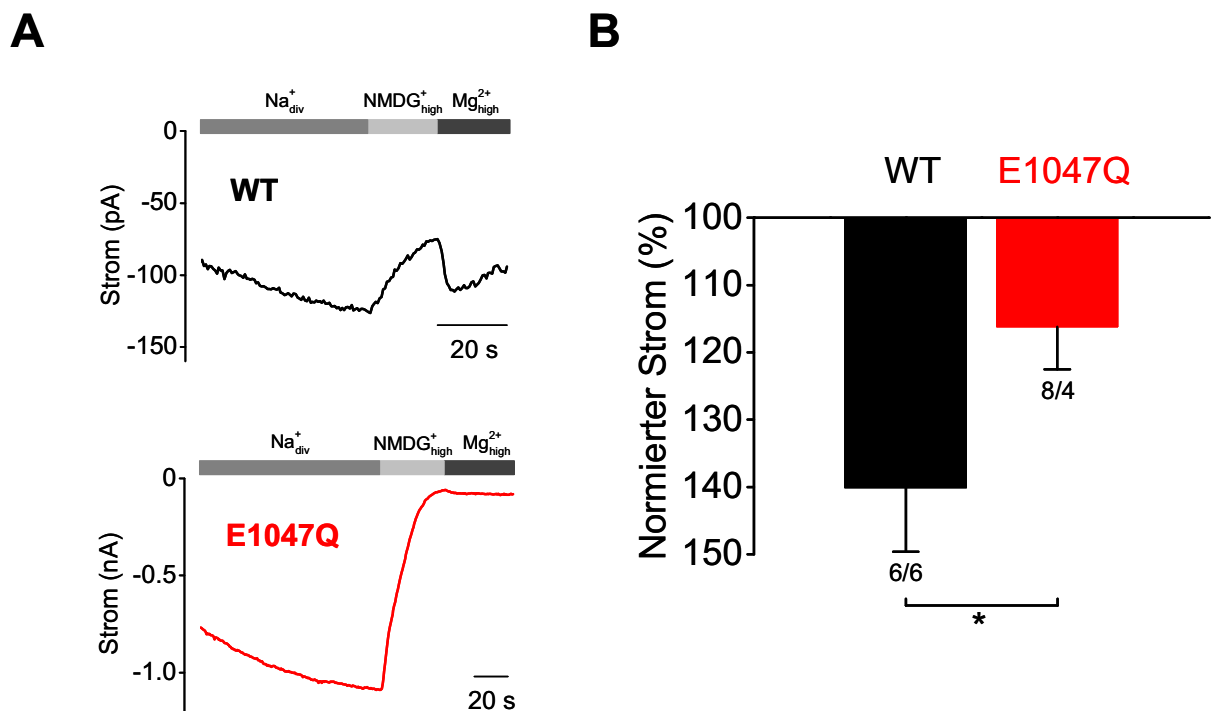


Abb. 3.28: Transiente Magnesium-Einwärtsströme bei TRPM7^{WT} und $\text{TRPM7}^{\text{E1047Q}}$

A: Exemplarische Strom-Zeitverläufe bei einem Haltepotential von -100 mV für TRPM7^{WT} und $\text{TRPM7}^{\text{E1047Q}}$ beim Lösungswechsel von NMDG-Lösung ($\text{NMDG}^{+}_{\text{high}}$) zu isotoner Magnesiumlösung ($\text{Mg}^{2+}_{\text{high}}$); **B:** Prozentuale Stromzunahme durch die Applikation von ' $\text{Mg}^{2+}_{\text{high}}$ ', normiert auf den geringsten Strom unter ' $\text{NMDG}^{+}_{\text{high}}$ '.

Zahlen unter den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen und unabhängigen Transfektionen; * = $p < 0,05$

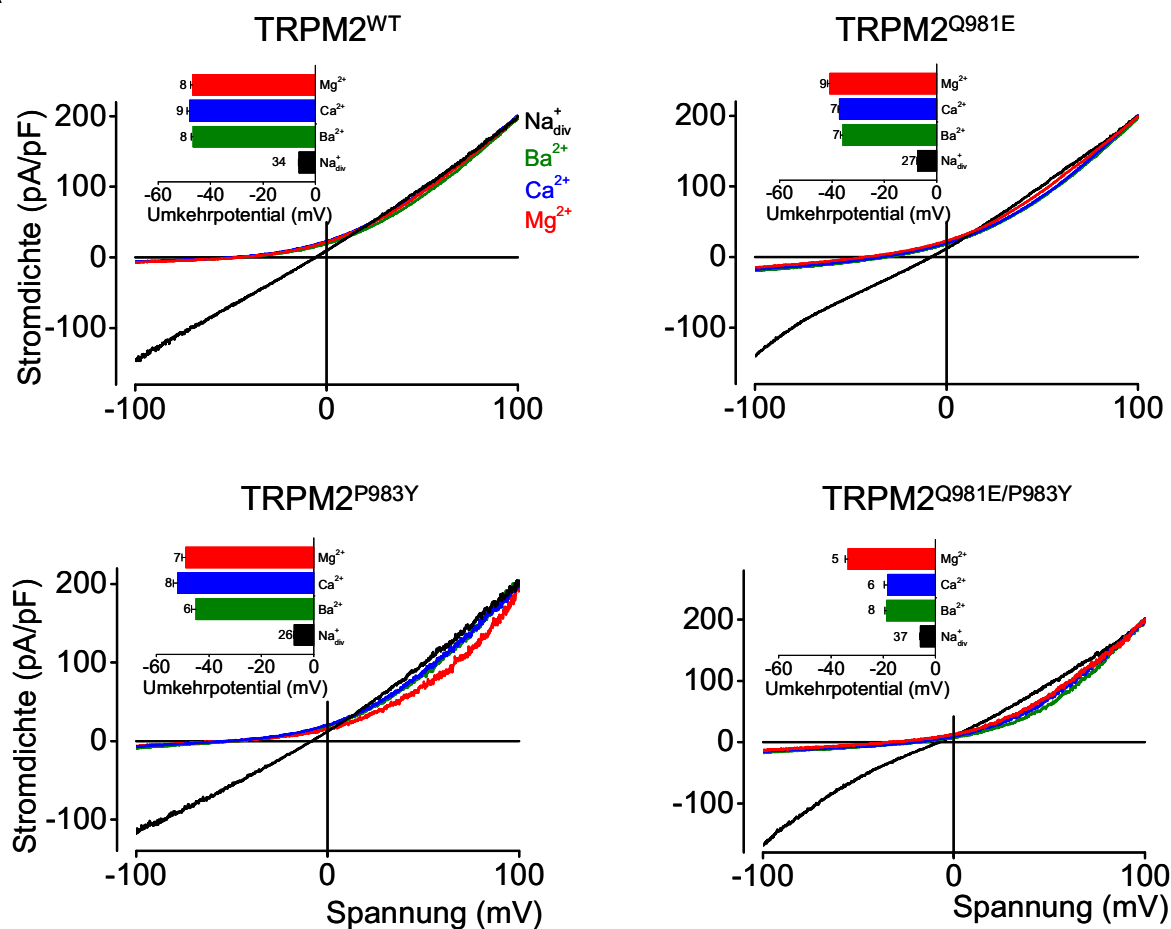
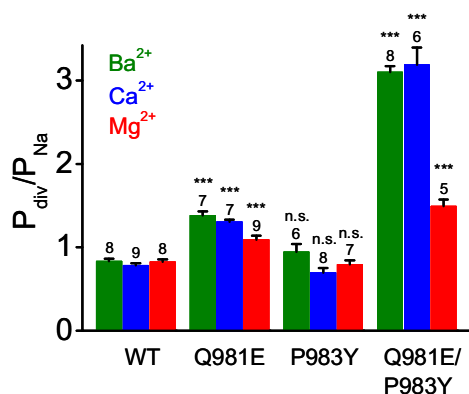
Die Abbildung 3.28 B zeigt die relativen Ströme bei einem Haltepotential von -100 mV für $\text{TRPM7}^{\text{E1047Q}}$ - und TRPM7^{WT} -Kanäle, wobei deutlich zu erkennen ist, dass die Stromzunahme beim transienten MagnesiumEinstrom durch den TRPM7^{WT} -Kanal deutlich höher ist als bei der $\text{TRPM7}^{\text{E1047Q}}$ -Mutante. Auch durch dieses Experiment konnte also belegt werden, dass im $\text{TRPM7}^{\text{E1047Q}}$ -Kanal die Magnesium-permeation massiv beeinträchtigt ist.

3.2.2 Reziproke Mutationen im TRPM2-Protein

Nachdem gezeigt wurde, dass der Austausch einzelner Aminosäuren starke Auswirkungen auf die Kanaleigenschaften des TRPM7 hat, sollte die Gültigkeit der über die Mutanten getroffenen Aussagen bezüglich der Permeabilitäten überprüft werden. Dazu wurden die entsprechenden gegenteiligen Mutationen - Q981E, P983Y und die Doppelmutante Q981E/P983Y - im TRPM2-Protein eingeführt und auf die gleiche Weise in Ganzzellmessungen analysiert wie die TRPM7-Varianten. Der Kanal wurde dabei mit 50 – 200 μ M ADP-Ribose aktiviert, die der Pipettenlösung beigefügt wurde. Die freie Calciumkonzentration der Pipettenlösung betrug 100 nM, da der TRPM2-Kanal intrazelluläres Calcium für seine Aktivität benötigt (Perraud et al., 2001; McHugh et al., 2003).

Die Analyse der Umkehrpotentiale bei den drei divalenten Lösungen ergab, dass zwar die TRPM2^{P983Y}-Mutante keine Änderung des Umkehrpotentials zeigte, aber bei der TRPM2^{Q981E}-Mutante und deutlicher bei der Doppelmutante TRPM2^{Q981E/P983Y} eine Rechtsverschiebung des Umkehrpotentials im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten war. Die sich daraus ergebenden Permeabilitäten waren bei beiden Mutanten hochsignifikant unterschiedlich zum Wildtyp, der kaum eine Präferenz für ein oder zweiwertige Kationen zeigte ($P_{Ca}/P_{Na} = 0,8 \pm 0,03$). Für die Doppelmutante war das Verhältnis der Calcium- zur Natriumpermeabilität sogar fast um das Vierfache gesteigert (Abb. 3.29 B). Zudem wiesen die Strom-Spannungs-Beziehungen beim TRPM2^{Q981E}-Kanal und der Doppelmutante bei negativen Potentialen eine deutliche Rektifizierung auf und wichen somit von der fast linearen Kurve des TRPM2^{WT}-Kanals ab (Abb. 3.29 A).

Durch ein Austausch der entsprechenden Aminosäuren im TRPM2-Protein zu den korrespondierenden Aminosäuren im TRPM7 konnte also eine Eigenschaft des TRPM7-Kanals, nämlich die erhöhte Divalentenpermeabilität, auf den TRPM2-Kanal übertragen werden.

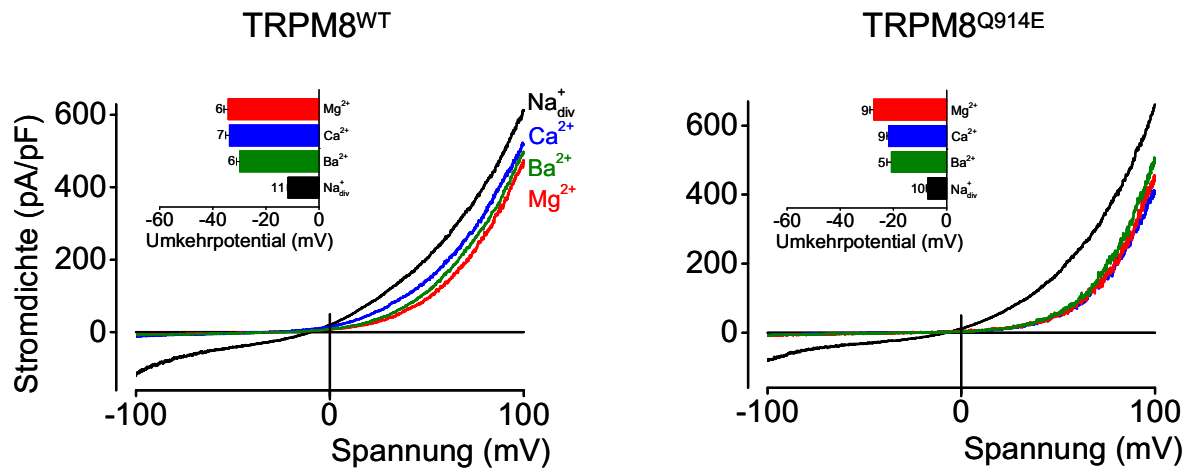
A**B****Abb. 3.29:** Analyse der Aminosäureaustausche Q981E und P983Y im TRPM2-Protein

A: Stromdichte-Spannungs-Beziehungen mittels einer Spannungsrampe von -100 bis +100 mV des TRPM2^{WT} sowie der Aminosäureaustausche Q981E und P983Y und der Doppelmutante Q981E/P983Y bei Applikation von physiologischer Badlösung (Na⁺_{div}), 10 mM Barium- (Ba²⁺), 10 mM Calcium- (Ca²⁺), oder 10 mM Magnesium-Lösung (Mg²⁺). Eingeschobene Graphen zeigen die jeweiligen Mittelwerte der Umkehrpotentiale; **B:** Aus den Umkehrpotentialen errechnete Permeabilitäten relativ zur Permeabilität von Na⁺. Zahlen an den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen; *** = p < 0,001; n.s. = nicht signifikant

3.2.3 Reziproke Mutationen im TRPM8-Protein

Auch im TRPM8-Protein, das am nächsten mit dem TRPM2-Protein verwandt ist, wurden die entsprechenden Aminosäuren Glutamin 914 und Prolin 916 in Richtung der Aminosäuren im TRPM7-Protein mutiert sowie die Doppelmutante TRPM8^{Q914E/P916Y} generiert. Die Aktivierung des Kanals erfolgte hier mit 10 μ M Icilin in der Badlösung bei Raumtemperatur.

A



B

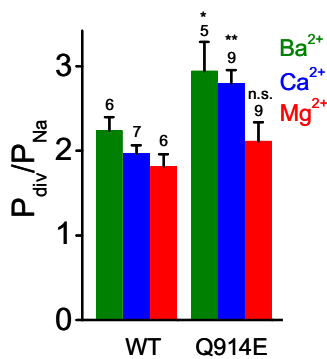


Abb. 3.30: Analyse des Aminosäureaustausches Q914E im TRPM8-Protein

A: Repräsentative Stromdichte-Spannungs-Beziehungen mittels einer Spannungsrampe von -100 bis +100 mV des TRPM8^{WT} sowie des Aminosäureaustausches Q914E bei Applikation von physiologischer Badlösung (Na⁺_{div}), 10 mM Barium- (Ba²⁺), 10 mM Calcium- (Ca²⁺), oder 10 mM Magnesium-Lösung (Mg²⁺). Eingeschobene Graphen zeigen die jeweiligen Mittelwerte der Umkehrpotentiale; **B:** Aus den Umkehrpotentialen errechnete Permeabilitäten relativ zur Permeabilität von Na⁺.

Zahlen an den Balken zeigen die Anzahl der gemessenen Zellen; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; n.s. = nicht signifikant

Die Versuche mit dem TRPM8-Kanal wurden ebenso wie die zum TRPM7-Kanal mit einer Pipettenlösung durchgeführt, die nur 5,5 nM freiem Calcium enthielt, um die Bedingungen möglichst einheitlich zu halten. Zwar ist für den TRPM8-Kanal be-

schrieben, dass für die Aktivierung mit Icilin intrazelluläres Calcium notwendig ist (Chuang et al., 2004), mit den hier gewählten hohen Icilin-Konzentrationen von 10 μM konnte aber immer noch eine starke Aktivierung des Kanals erreicht werden. Der Prolin zu Tyrosin Austausch führte offensichtlich zu nicht-funktionellen Proteinen, da weder in *patch clamp*-Versuchen noch in Calciummessungen Strom- bzw. Calciumantworten detektiert werden konnten, vermutlich war aus diesem Grund auch die Doppelmutante TRPM8^{Q914E/P916Y} nicht funktionell. Im Gegensatz dazu konnte im Glutamin 914 zu Glutamat Austausch die gleichen Auswirkungen beobachtet werden, die schon bei Messung des TRPM2-Kanals auftraten: Eine deutliche Rechtsverschiebung der Umkehrpotentiale bei divalenten Badlösungen und zumindest für Calcium- und Barium-Ionen eine signifikant erhöhte Permeation im Vergleich zum TRPM8^{WT}-Kanal (Abb. 3.30).

Zudem bestätigte sich bei der Analyse der Mutante TRPM8^{Q914E} in Aequorin-basierten Calciummessungen die erhöhte Calciumpermeabilität des mutierten Kanals. Die Mutante erlangte einen signifikant höheren Calciumeinstrom nach der Aktivierung durch Icilin als der TRPM8^{WT}-Kanal (Abb. 3.31).

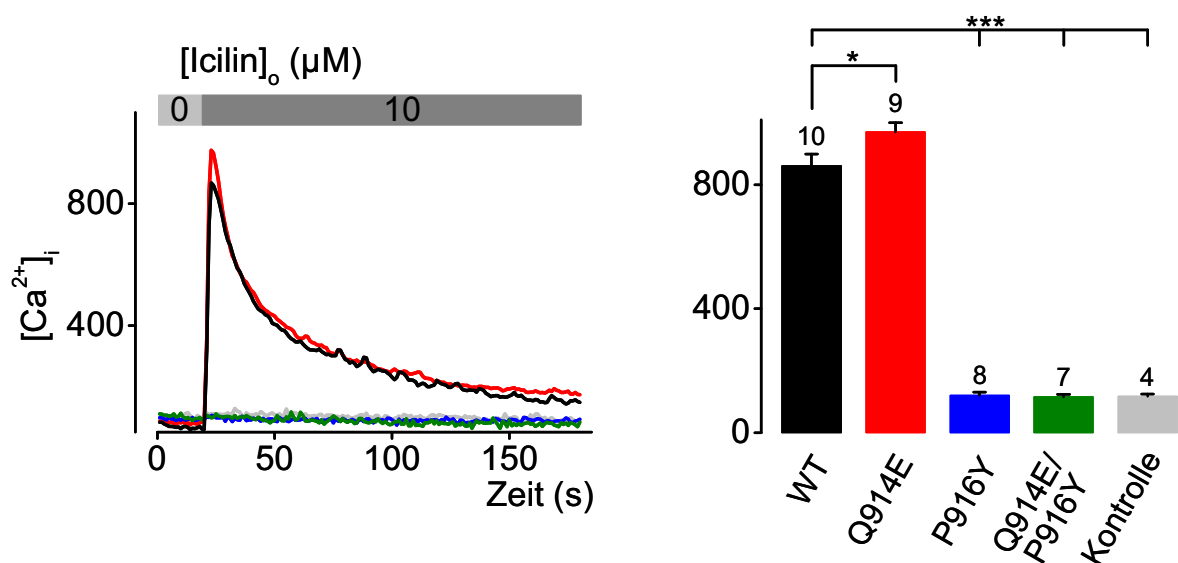


Abb. 3.31: Calciummessungen der Mutanten Q914E, P916Y und Q914E/P916Y im TRPM7-Protein mittels Aequorin-Biolumineszenz

Exemplarische Calciumantworten auf die Applikation von 10 μM Icilin bei 1 mM Calcium in der Badlösung, Jede Kurve entspricht der Antwort von 1×10^5 Zellen (links); Entsprechende Mittelwerte der Calciumantworten für die angezeigten Expressionen 15 s nach Aktivierung durch Icilin (rechts); als Kontrolle wurde der Leervektor pcDNA3.1 verwendet.

Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der unabhängigen Transfektionen; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$

Auch für das TRPM8-Protein konnte also die Bedeutung des Glutamins für die Permeationseigenschaften belegt werden. Wie im TRPM2 führte auch hier die Substitution des Glutamins durch Glutamat zu einer erhöhten Divalentenpermeation der entstehenden Kanäle.

3.2.4 Phylogenetische Analyse der TRPM-Subfamilie

3.2.4.1 TRPM-Gene in verschiedenen Entwicklungsstufen

Bei Analyse der anderen Mitglieder der TRPM-Subfamilie im Hinblick auf das Vorhandensein des 'EVY'-Motivs in der hoch konservierten Porenregion fiel auf, dass TRPM1 und TRPM3 ebenfalls ein Glutamat an der zur Aminosäure 1047 im TRPM7-Protein entsprechenden Position besitzen. Statt des Tyrosins findet sich hier ein Phenylalanin, für das am Beispiel des TRPM7 aber gezeigt wurde, dass es keine Auswirkungen auf die Kanalfunktion besitzt (s. Kapitel 3.2.1.3). Das TRPM4- und TRPM5-Protein besitzen an diesen Positionen ein Glutamin und Prolin, also die entsprechenden Aminosäuren wie im TRPM2 (Abb. 3.32 A). Somit besitzen die jeweils näher verwandten Kanalproteine eine vergleichbare Aminosäuresequenz (Abb. 3.32 B).

Diese Verteilung legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine Änderung handelt, die sich im Laufe der Evolution manifestiert hat. Dies sollte durch einen Aminosäuresequenzvergleich des Bereiches vom Beginn der Transmembrandomäne 1 bis einschließlich der Transmembrandomäne 6 von TRPM-Kanälen mit im Netz verfügbaren cDNA-Sequenzen aus verschiedenen Spezies überprüft werden. In der jüngeren Vergangenheit wurden den Gendatenbanken die Sequenzen vieler neuer Proteine hinzugefügt, so dass erstmals eine phylogenetische Analyse möglich ist, die Aufschluss über die Evolution der TRP-Kanalfamilie geben könnte.

Wenn noch keine Terminologie für die gefundenen Gene bzw. cDNAs vergeben war, wurde eine Bezeichnung aufgrund der Sequenzähnlichkeit der Regionen von Transmembrandomäne 1-6 sowie des Vorhandenseins einer C-terminalen Enzymdomäne zugeordnet. Falls keine eindeutige Übereinstimmung mit einem bestimmten Kanal gefunden werden konnte, wurden Proteine mit einer Nudix-Domäne am C-terminalen Ende als TRPM2- und solche ohne als TRPM3-artigen Proteine bezeichnet. Die Spezies, aus denen die verglichenen Sequenzen stammen, sind in der Tabelle 2.1 zusammengefasst (s. Kapitel 2.4.3.2).

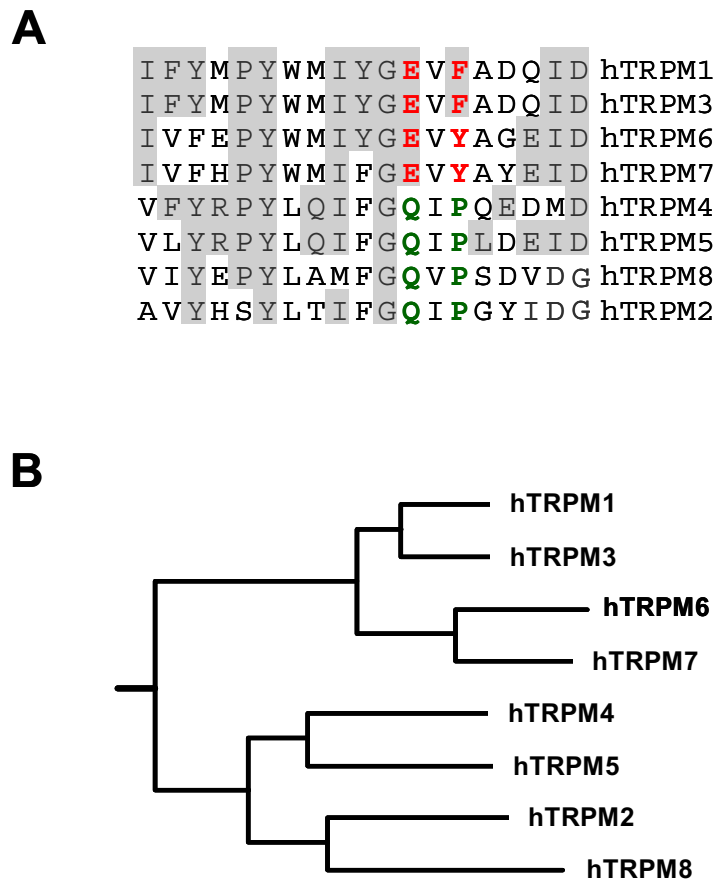


Abb. 3.32: Vergleich der Porensequenzen bei TRPM-Kanälen

A: Aminosäuresequenz-Vergleich der Porenregionen von humanen TRPM-Proteinen (rot). Konservierte Aminosäureaustausche sind grau hinterlegt; **B:** Stammbaum der TRPM-Proteine.

Beim Vergleich der Sequenzen war festzustellen, dass einfachere Organismen deutlich weniger verschiedene TRPM-Proteine besitzen als höher abgeleitete Spezies. Säugetiere weisen alle acht TRPM-Mitglieder auf, während frühe Vertebraten wie *Hyperoartia* lediglich TRPM2- und TRPM3-ähnliche Proteine besitzen. Diese beiden Gene sind auch noch in den am nächsten verwandten Invertebraten - Tunikaten und Cephalochordaten - zu finden. Wenn man auf Organismen schaut, die nicht mehr zu den Bilateralia gehören, wie Cnidaria, tauchen lediglich TRPM2-ähnliche Gene auf. Sogar in einem einzelligen Protisten, dem Choanoflagellaten *Monosiga brevicollis*, ist ein TRPM2-ähnliches Protein vorhanden. In Grünalgen, Pilzen und Pflanzen sind hingegen keine TRPM-Gene zu finden. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass das ursprünglich vorhandene TRPM-Gen ein TRPM2-ähnliches Protein war, aus dem sich die anderen Mitglieder der Subfamilie durch Genduplikationen entwickelt haben könnten.

Um sicher zu gehen, dass das ursprünglichste zu findende TRPM-Protein ausreichende strukturelle Ähnlichkeiten zu den heute bekannten Proteinen hat, wurden dreidimensionale Modelle von Teilen des TRPM2-ähnlichen Proteins aus *Monosiga brevicollis* generiert. Dann wurde ein Modell des C-Terminus mit der Kristallstruktur des mitochondrialen, humanen NUDT9-Proteins verglichen, zudem fand ein Vergleich der Transmembrandomänen fünf und sechs mit einer Kristallstruktur der porenbildenden Region aus dem spannungsabhängigen Kaliumkanal KvAP statt. In beiden Fällen konnte eine große Übereinstimmung der Strukturen gefunden werden, auch wenn das ursprüngliche TRPM2-Protein eine deutlich längere Porenschleife besitzt als das TRPM2-Protein aus Säugetieren.

3.2.4.2 Modell der Evolution von TRPM-Proteinen

Wenn man bei den gefundenen Sequenzen auf das Vorhandensein der 'EVY'- oder 'QIP'-Sequenz schaut, wird deutlich, dass dieses Motiv in der Entwicklung der TRPM-Kanäle hochkonserviert ist.

Porenhelix										Proximale Porenschleife									
V	I	F	R	P	Y	F	Q	I	Y	G	E	L	F	L	E	D	I	S	mbTRPM2-like 1
V	L	Y	R	P	Y	F	Q	I	Y	G	E	L	F	L	E	E	M	N	mbTRPM2-like 2
V	V	Q	Y	P	Y	W	Q	M	Y	G	E	L	F	L	D	E	I	Q	nvTRPM2-like 1
I	F	F	R	P	Y	F	Q	V	Y	G	E	L	F	I	E	D	V	D	nvTRPM2-like 2
I	F	F	R	P	Y	F	Q	I	Y	G	E	L	F	I	T	D	P	I	nvTRPM2-like 3
I	L	M	R	S	Y	F	Q	I	F	G	E	L	F	L	E	V	I	E	spTRPM2-like
I	F	Y	R	S	Y	F	Q	I	Y	G	E	L	F	L	E	E	L	E	spTRPM3-like 1
A	L	V	V	P	Y	F	Q	I	Y	G	E	L	Y	L	D	A	I	Q	spTRPM3-like 2
V	P	R	K	A	Y	W	Q	I	Y	G	E	L	F	L	E	D	I	E	lgTRPM2-like
I	L	Y	L	P	Y	W	Q	M	Y	G	E	L	F	L	E	R	V	E	lgTRPM3-like 1
I	W	F	Y	P	Y	W	M	I	Y	G	E	L	F	A	D	E	I	D	lgTRPM3-like 2
I	F	L	K	P	Y	F	M	L	Y	G	E	V	Y	A	D	E	I	D	ceGon-2
I	F	L	Q	P	Y	F	M	L	Y	G	E	V	Y	A	A	E	I	D	ceGTL-1
I	F	Y	K	P	Y	F	M	L	Y	G	E	V	Y	A	G	E	I	D	ceGTL-2
V	T	F	Q	P	Y	F	M	L	Y	G	E	V	F	A	G	D	I	D	dmTRPM
V	L	S	K	P	Y	W	Q	I	Y	G	E	L	F	L	S	E	I	H	csTRPM2-like
V	A	L	E	P	Y	F	M	L	Y	G	E	V	Y	A	G	T	I	D	csTRPM3-like
I	F	H	K	A	Y	F	Q	I	Y	G	E	L	F	L	E	E	I	M	bfTRPM2-like
A	V	R	I	P	Y	W	Q	M	Y	G	D	L	F	T	D	D	D	G	bfTRPM3-like
I	F	Y	M	P	Y	W	M	I	Y	G	E	V	F	A	D	Q	I	D	hTRPM1
I	F	Y	M	P	Y	W	M	I	Y	G	E	V	F	A	D	Q	I	D	hTRPM3
I	V	F	E	P	Y	W	M	I	Y	G	E	V	Y	A	G	E	I	D	hTRPM6
I	V	F	H	P	Y	W	M	I	F	G	E	V	Y	A	Y	E	I	D	hTRPM7
V	F	Y	R	P	Y	L	Q	I	F	G	Q	I	P	Q	E	D	M	D	hTRPM4
V	L	Y	R	P	Y	L	Q	I	F	G	Q	I	P	L	D	E	I	D	hTRPM5
V	I	Y	E	P	Y	L	A	M	F	G	Q	V	P	S	D	V	D	G	hTRPM8
A	V	Y	H	S	Y	L	T	I	F	G	Q	I	P	G	Y	I	D	G	hTRPM2

Abb. 3.33: Aminosäuresequenz-Vergleich der porenbildenden Region von TRPM-Proteinen. Vergleich der Aminosäuresequenzen von Porenhelix und proximaler Porenschleife bei TRPM-Proteinen aus folgenden Spezies: *Monosiga brevicollis* (mbTRPM2-like 1, mbTRPM2-like 2), *Nematostella vectensis* (nvTRPM2-like 1, nvTRPM2-like 2, nvTRPM2-like 3), *Strongylocentrotus purpuratus* (spTRPM2-like, spTRPM3-like 1, spTRPM3-like 2), *Lottia gigantea* (lgTRPM2-like, lgTRPM3-like 1, lgTRPM3-like 2), *C. elegans* (ceGon-2, ceGTL-1, ceGTL-2), *D. melanogaster* (dmTRPM), *Ciona savignyi* (csTRPM2-like, csTRPM3-like), *Branchiostoma floridae* (bfTRPM2-like, bfTRPM3-like 1, bfTRPM3-like 2), *H. sapiens* (hTRPM1-8).

Dabei weisen alle TRPM2- oder TRPM3-ähnlichen Kanäle in früher abgeleiteten Organismen ausschließlich das 'EVY'-Motiv auf; das 'QIP'-Motiv tritt erst in höher entwickelten Vertebraten in Erscheinung (Abb. 3.33). Interessanterweise ist unter den 'modernen' Kanälen mit dem 'QIP'-Motiv auch der humane TRPM2 zu finden, während die ursprünglicheren TRPM2-Proteine noch ein Glutamat und ein Phenylalanin an diesen Positionen besitzen. Somit könnte das ursprüngliche TRPM-Protein ein TRPM2-ähnliches gewesen sein, jedoch besaß es das ursprüngliche Motiv 'EVY'. Im Gegensatz dazu sind TRPM1, TRPM3, TRPM6 und TRPM7 moderne Kanäle, die aber immer noch das ursprüngliche Sequenzmotiv 'EVY' besitzen.

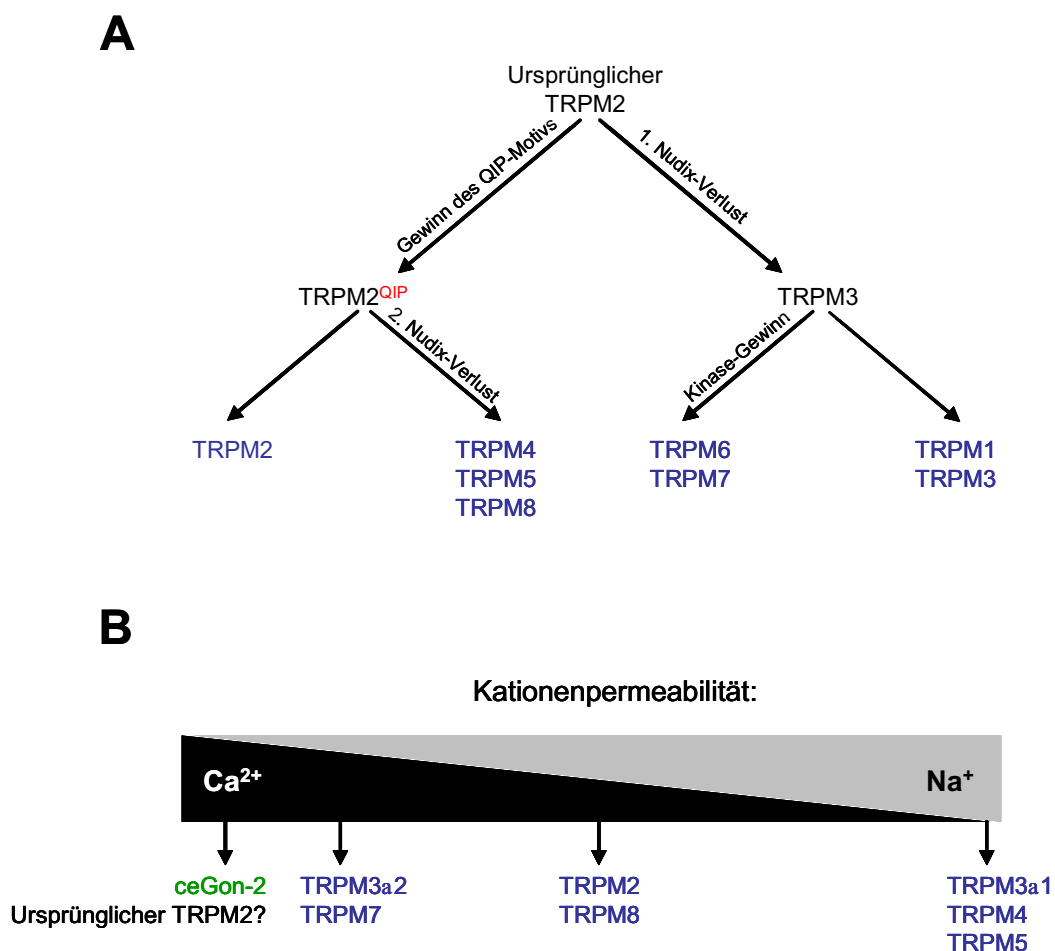


Abb. 3.34: Modell der Veränderungen in Struktur und Selektivität von TRPM-Proteinen während der Evolution

A: Evolutionäre Veränderungen im Aufbau von ursprünglichen TRPM-Proteinen (schwarz) und denen aus Säugetieren (blau), die kritischen Aminosäuren sind rot dargestellt (Details siehe Text); **B:** Vereinfachtes Schema der Kationenpermeation in TRPM-Kanälen. Säugetier-TRPMs (blau) und Gon-2 aus *C. elegans* (grün) sind entsprechend ihrer Permeationseigenschaften platziert. Die Position des ursprünglichen TRPM2-ähnlichen Kanals (schwarz) wird postuliert.

Auf Basis dieser Beobachtungen lässt sich ein möglicher Ablauf der Evolution von TRPM-Proteinen postulieren: Das ursprüngliche TRPM-Protein war ein TRPM2-ähnliches Protein mit einer Nudix-Domäne und dem „EVY“-Motiv. Ein erster Verlust der Nudix-Domäne führte zu der Entwicklung von TRPM3-ähnlichen Kanälen. Die Fusion mit einer Kinasedomäne bewirkte die Entstehung von TRPM6- und TRPM7-Proteinen in Vertebraten. Ein anderer evolutionärer Weg begann mit dem Gewinn des „QIP“-Motivs in ursprünglichen Vertebraten. Hier führte der sekundäre Verlust der Nudix-Domäne zu den modernen Kanälen TRPM4, TRPM5 und TRPM8 (Abb. 3.34 A).

Die funktionellen Auswirkungen dieser Aminosäureaustausche auf die Permeationseigenschaften wurden in dieser Arbeit schon beschrieben. Somit lässt sich ein Schema erstellen, in dem die TRPM-Kanäle entsprechend ihrer Permeationseigenschaften angeordnet sind und in dem auch die Position des TRPM2-ähnlichen Proteins aus *Monosiga brevicollis* postuliert werden kann. Vorausgesetzt das Protein ist in der Lage, einen funktionellen Kanal zu bilden, ist anzunehmen, dass es sich hierbei um einen Calcium-permeablen Kanal handelt (Abb. 3.34 B).

4 DISKUSSION

4.1 Patientenmutanten

Bei früheren Untersuchungen zu den genetischen Ursachen für Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie (HSH) wurden bereits verschiedene Mutationen im TRPM6-Gen, die offensichtlich (mit-)verantwortlich für die Ausprägung der Krankheit sind, gefunden (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002; Chubанov et al., 2004). Dabei handelte es sich fast immer um Punktmutationen, die zu Translationsabbrüchen, verändertem Spleißen oder als Deletionen zu Verschiebungen des Leserasters mit daraus resultierenden Translationsabbrüchen führten. Die einzige beschriebene Mutation, die in einem vollständigen Protein resultiert, S141L, konnte nicht an die Zelloberfläche transportiert werden (Chubанov et al., 2004).

In dieser Arbeit wird erstmals eine Punktmutation in der porenbildenden Region beschrieben und funktionell analysiert, die vollständig transkribiert, translatiert und als zur Multimerisierung befähigtes Protein an die Zellmembran gebracht wird. Der betroffene Patient litt nachweislich an HSH-typischen Symptomen wie Hypomagnesiämie und Hypocalciämie und allgemeinen Krampfanfällen. Er unterschied sich somit im klinischen Bild nicht von den Patienten, bei denen eine der früher beschriebenen Mutationen für die Ausbildung der HSH verantwortlich war (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002; Schlingmann et al., 2005).

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Mutation wurde der entsprechende Aminosäureaustausch P1017R in der Spleiß-Variante 1A der TRPM6-cDNA durchgeführt und im heterologen Expressionssystem untersucht. Zudem wurde die homologe Mutation P1040R im TRPM7-Protein generiert. Als Zelllinien standen HEK293-Zellen sowie induzierbare Zelllinien, die das TRPM6- bzw. TRPM7-Protein stabil exprimieren, zur Verfügung, die zuvor charakterisiert wurden. Es wurde zum einen festgestellt, dass nur die Zelllinie TRPM7^{pIND} nach Induktion mit Ponasteron A zur Stromentwicklung in der Lage war, obwohl beide Zelllinien prinzipiell funktionsfähiges Protein exprimieren. Des weiteren konnte festgestellt werden, dass beide Mutanten zu keiner Stromamplifikation in der Lage waren und sogar den Strom in induzierten TRPM7^{pIND}-Zellen sowie den endogenen Strom in HEK293-Zellen unterdrücken konnten. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die Mutation P1017R im TRPM6-Protein grundlegend an der Ausbildung von Hypo-

magnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie beteiligt ist, da aufgrund dieser Mutation keine funktionsfähigen TRPM6-Kanäle zur Resorption von Magnesium in Darm und Niere zur Verfügung stehen.

4.1.1 Zelllinien und Transfektionen

Für die Messungen von TRPM7-Strömen mittels der *patch clamp*-Technik wurde eine Pipettenlösung ohne Magnesium oder Magnesium-ATP gewählt. Auf diese Weise konnten auch die in HEK293-Zellen endogen vorhandenen TRPM7-Kanäle sichtbar gemacht werden, was sich in einer deutlichen mittleren Stromzunahme im Vergleich zu Messungen mit 1 mM Magnesium in der Pipettenlösung äußerte. Die durchschnittlichen Stromdichten der Messungen mit 1 mM Magnesium liegen mit 54 pA/pF zum Teil recht nahe an Angaben der Literatur, die mit Stromdichten von 41 pA/pF (Zhu et al., 1998) angegeben werden, wobei sich die Lösungen zum Teil stark von den hier verwendeten unterschieden. Eine weitere Quelle gibt eine Stromdichte von 19 pA/pF bei einer Spannung von +40 mV an (Yu und Kerchner, 1998), was ebenfalls mit den hier gewonnenen Daten übereinstimmt.

Für die EcR293-Zelllinie wurde gezeigt, dass die Induktion mit Ponasteron A zu keiner signifikanten Stromerhöhung führte. Somit wurde allein durch die Expression des Ecdyson-Rezeptors in dieser Zelllinie keine vermehrte Translation von endogenen Kanälen induziert.

Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Zelllinien TRPM7^{pIND} und TRPM6^{pIND} funktionsfähiges Kanalprotein exprimieren. In der Zelllinie TRPM6^{pIND} gelang dies jedoch nicht aufgrund einer signifikanten Stromerhöhung nach der Induktion mit Ponasteron A, sondern der Beweis wurde indirekt durch die zusätzliche transiente Expression von TRPM7-Proteinen erbracht. Die daraus resultierenden Stromdichten fielen deutlich höher aus als bei einer vergleichenden Expression von TRPM7-Proteinen in HEK293-Zellen, wobei aufgrund der starken Varianzen bei den Messungen kein Signifikanz festgestellt werden konnte. Auch in Oocytenversuchen im Rahmen der Studien zu den Zelllinien konnten nach Injektion von TRPM6-cRNA keine Stromerhöhung im Vergleich zu nicht-injizierten Zellen festgestellt werden (Chubanov et al., 2007). Zudem wurden unter Verwendung eines TRPM6-spezifischen Antikörpers auch Proteinmengen-Bestimmungen (*Western Blots*) an uninduzierten und induzierten Zellen durchgeführt, die das Protein ausschließlich nach der Induktion mit Ponasteron A nachweisen konnten. Mit demselben Antikörper

wurde das Protein zusätzlich in immuncytochemische Färbungen in den Zellen nachgewiesen, wobei die Lokalisation in den TRPM6^{pIND}-Zellen sich auf das Zellinnere beschränkte (Chubnov et al., 2007). Aufgrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass das TRPM6-Protein nicht in der Lage ist, funktionelle homomere Kanäle zu bilden, da in drei unabhängige Expressionssysteme – Expression in stabiler Zelllinie, HEK293-Zellen sowie in Oozyten - keine TRPM6-Ströme beobachtet werden konnten. Zudem konnte das Protein weder als YFP-Fusionsprotein noch mittels Antikörper-Färbung in der Zellmembran nachgewiesen werden.

Bei TRPM7^{pIND}-Zellen konnte direkt die Entwicklung der TRPM7-typischen Ströme nachgewiesen werden. Allerdings wurde, obwohl es sich um eine monoklonale Zelllinie handelt, eine hohe Varianz bei den Stromdichten festgestellt. Dies beeinflusst oder verfälscht jedoch nicht die deutlichen Ergebnisse, die im Verlauf der Untersuchungen generiert wurden. Es sind verschiedene Hintergründe für diese Varianz möglich. Es könnte sein, dass der Zugriff auf die Zellen je nach Messung variierte und die Zellen somit unterschiedlich gut durch die magnesiumfreie Pipettenlösung dialysiert wurden. Das würde dazu führen, dass die Zellen durch noch verbliebenes intrazelluläres Magnesium an einer stärkeren Stromentwicklung gehindert wurden. Allerdings wurde in den Versuchen darauf geachtet, dass die Zugriffswiderstände sich im Bereich von unter 10 MΩ bewegten. Zudem entwickelten teilweise auch Zellen mit einem sehr guten Zugriffswiderstand nur kleine Ströme, so dass dies nicht die alleinige Erklärung sein kann. Eine weitere Annahme ist, dass das im Genom inserierte Kanalgene in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen vermehrt oder weniger stark abgelesen wird. Es ist bekannt, dass verschiedene Regionen des Genoms in bestimmten Phasen des Zellzyklus weniger verwendet werden. Sollte die eingefügte, rekombinante DNA bei der Herstellung der Zelllinie an einem solchen Lokus des Genoms der Zelle inserieren, würde dies dazu führen, dass es während einer oder mehrerer Phasen des Zellzyklusses kaum abgelesen und somit nur in geringen Mengen exprimiert wird. Es ist auch möglich, dass bereits translatierte Kanalproteine in der Zelle in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus unterschiedlich durch zelleigene Faktoren reguliert werden. Weiterhin ist es auch denkbar, dass die Expressionsstärke allgemein von der Konstitution der Zelle abhängt. Auch hier könnte wiederum hintergründig die Zyklusphase, in der sich die Zelle befindet, verantwortlich sein. Ein Nachweis hierzu könnte gelingen, indem die Zellen in ihrem

Zellzyklus synchronisiert und dann zu unterschiedlichen Zeiten vergleichende Messungen vorgenommen werden. Diese Synchronisation ist durch verschiedene Chemikalien möglich, anschließend können die Zellen in diesem Zyklus arretiert werden (Tani et al., 2007). Bei entsprechenden Versuchen für endogen vorkommende MIC-Ströme wurde schon gezeigt, dass in verschiedenen Stadien des Zellzyklus unterschiedliche Stärken in der Kanalaktivität zu finden waren. So wurde für Retinoblastenzellen festgestellt, dass im Übergang der G1- zur S-Phase die höchsten MagNuM-Ströme zu messen waren (Hanano et al., 2004). Für die gleichen Ströme war in RBL-Zellen, einer basophilen Mastzelllinie aus Ratten, eine erhöhte Aktivität in der G1-Phase nachgewiesen (Tani et al., 2007) worden. Diese Variationen in der Kanalaktivität könnten unterschiedlichen Anforderungen an Magnesium- und Calciumeinströmen in bestimmten Zellzyklusphasen dienen. Sollte sich diese Annahme bestätigen, wäre es sinnvoll, Zelllinien zu verwenden, bei denen der Insertionsort des Gens sehr genau bestimmt werden kann, so dass eine gleichmäßige Expression des Gens gewährleistet ist.

Es besteht bei transienten Expressionen in bereits induzierten Zelllinien die Gefahr, dass die beiden Expressionssysteme in Konkurrenz zueinander stehen. Wenn also eins der heterologen Expressionssysteme einen passenderen Promotor besitzt, würde das entsprechende Gen in höherem Maße abgelesen. Zudem könnte die Translationsmaschinerie durch die Induktion bereits ausgelastet sein, so dass die zusätzlich transfizierte cDNA nur noch in geringem Maße translatiert wird. Beides würde dazu führen, dass die Kanalproteine eventuell in einem dramatischen Missverhältnis in der Zelle vorkommen, wodurch einige Aussagen an Wert verlieren würden. Für die durchgeführten Versuche kann zum einen angenommen werden, dass bei der Kotransfektion eines Kanals in der induzierten Zelllinie beide Proteine in ausreichender Menge in der Zelle vorhanden sind, da sonst Effekte wie Stromzunahmen im Vergleich zur reinen induzierten Zelllinie (Kotransfektion von TRPM6^{WT} in TRPM7^{pIND}) bzw. Suppression der Ströme in der induzierten Zelllinie (Kotransfektion von TRPM6^{P1017R} oder TRPM6^{P1040R} in TRPM7^{pIND}) nicht möglich gewesen wären. Zum anderen kann davon ausgegangen werden, dass in diesen Versuchen die Kapazitäten der Zelle bezüglich der Proteinsynthese nicht vollständig ausgenutzt wurden, denn während bei den Messungen des TRPM7-Kanal in einzelnen Fällen Stromdichten von über 3000 pA/pF gemessen wurden, lagen die

meisten Messungen deutlich darunter. Das bedeutet, dass bei einem Großteil der Messungen nicht die maximal mögliche Proteinmenge in den Zellen vorhanden war. Während die Induktion der Zelllinie TRPM6^{pIND} mit keiner auffälligen Änderung der Zellmorphologie einherging, zeigte sich bei der TRPM7^{pIND}-Zelllinie nach 48-stündiger Induktion mit Ponasteron A eine deutliche Deformation der Zellen. Solche Effekte infolge einer starken Überexpression von TRPM7-Protein wurden schon in früheren Studien gezeigt (Nadler et al., 2001; Schmitz et al., 2003; Su et al., 2006). Diese Veränderungen beruhen auf einer Abnahme der Motilität infolge einer starken Expression von TRPM7-Protein, die nachfolgend zu der Bildung von Zellhaufen führt. Gleichzeitig ist aber auch die völlige Abwesenheit von TRPM7-Protein letal für die Zellen (Nadler et al., 2001; Schmitz et al., 2003). Ein ähnliches duales Verhalten ist auch für das TRPM8-Protein beschrieben worden, bei dem sowohl eine Inhibition als auch eine übermäßige Stimulation des Kanals die Überlebensfähigkeit einer Prostatakrebs-Zelllinie (LNCaP) herabsetzte (Zhang und Barritt, 2004). Die Tatsache, dass in der TRPM6^{pIND}-Zelllinie keine Schädigung der Zellen zu beobachten war, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der TRPM6 zumindest unter Zellkultur-Bedingungen keinen funktionellen, homomeren Kanal bildet. Angesichts der Annahme, dass der TRPM6- und TRPM7-Kanal recht ähnliche Eigenschaften haben, hätten sich in diesem Fall vergleichbare Auswirkungen einer Induktion auf die Morphologie der Zellen zeigen müssen. Da nicht nachgewiesen werden konnte, dass das TRPM6-Protein funktionelle Kanäle bildet, wurde beschlossen, die Analyse der Patientenmutante P1017R in der TRPM7^{pIND}-Zelllinie durchzuführen, in der es nachweislich zu einer Heteromultimerisierung zwischen TRPM6- und TRPM7-Kanaluntereinheiten kommen konnte. Auch die HEK293-Zelllinie schien für vergleichende Messungen geeignet, da die gefundenen Unterschiede in den Stromdichten der verschiedenen Zelllinien nicht auf einen systematischen Fehler hinweisen.

Bei den Stromdichten der Anfangsströme war der Wert der TRPM7^{pIND}-Zelllinie im Vergleich zu den anderen Zelllinien höher, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei nur um ein technisches Problem handelt, da nach Herstellung der Ganzzellkonfiguration noch eine gewisse Zeit für Einstellungen innerhalb des Pulse-Programms benötigt wurde, bis die eigentliche Messung gestartet werden konnte. In diesem Zeitraum entwickelte die TRPM7^{pIND}-Zelllinie, welche ja induziert die stärkste Stromentwicklung aufwies, schon einen

gewissen Strom, der allerdings noch nicht aufgezeichnet wurde. Somit spiegelt die erste gemessene Rampe nicht den Zustand direkt nach der Etablierung des Ganzellmodus wieder. Diese Zelllinie erreichte demnach nicht nur die höchsten Ströme, weil sie von einem höheren Niveau aus startete.

4.1.2 P1017R und andere Mutationen im TRPM6-Protein

Die hier beschriebene Mutation im TRPM6-Protein, P1017R, stellt den erste bekannten Aminosäureaustausch im Zusammenhang mit HSH dar, der sich im Bereich der putativen porenbildenden Region befindet. Diese Position lassen strukturelle Prognosen, die auf dem Modell des spannungsabhängigen Kaliumkanals KvAP basierend hergestellt wurden, vermuten. Die mutierte Aminosäure P1017 befindet sich zwischen den Transmembrandomänen fünf und sechs des TRPM6-Proteins, einer Region mit relativ geringer Homologie zu anderen TRP-Kanälen. Sie kann in diesem Modell der putativen Porenhelix zugeordnet werden, die ein konserviertes Element in vielen Ionenkanälen darstellt (Owsianik et al., 2006). Diese Prognosen scheinen recht verlässlich zu sein, da das Modell der S5/S6-Domäne des TRPM6-Proteins sehr gut mit den strukturellen Vorhersagen für diese Region im TRPM4 übereinstimmt (Nilius et al., 2005a). Zudem lässt die auf diesem Modell beruhende strukturelle Analyse vermuten, dass einzelne Aminosäuren im Bereich der Porenhelix Einfluss auf die Faltung der Porenschleife nehmen können. Für die P1017R-Mutation wird vermutet, dass sie die komplette Faltung der Porenhelix verändert, wodurch sie Einfluss auf die Permeationseigenschaften des Kanals nimmt.

Diese Annahme wurde durch transiente Expression von TRPM6^{WT}- oder TRPM6^{P1017R}-Protein in HEK293-Zellen oder das TRPM7-Protein stabil exprimierende HEK293-Zellen überprüft. Dabei zeigte sich, dass das TRPM6-Protein allein keine signifikante Kanalaktivität aufwies, während die Expression zusammen mit TRPM7-Protein einen deutlichen Anstieg in den Strömhöhen hervorrief. Im Gegensatz zum Wildtyp verursachte der TRPM6^{P1017R}-Kanal bei Koexpression mit TRPM7-Protein keine Stromamplifikation in HEK293-Zellen, zudem unterdrückte er auch die durch TRPM7-Kanäle generierten Ströme auf ein Niveau unterhalb des in HEK293-Zellen vorhandenen endogenen Stromes. Durch konfokale Mikroskopie wurde bestätigt, dass TRPM6^{P1017R}/TRPM7^{WT}-Komplexe, ähnlich den TRPM6^{WT}/TRPM7^{WT}-Komplexen, an die Oberfläche der Zellen gelangten, während

dies bei einer alleinigen Expression von TRPM6^{P1017R} nicht der Fall war. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das TRPM6-Protein mit der Mutation P1017R erfolgreich mit TRPM7-Kanaluntereinheiten assembliert, dabei aber einen dominant-negativen Einfluss auf die Aktivität des Kanalkomplexes ausübt. Somit unterscheidet sich P1017R sowohl in seinen biophysikalischen Eigenschaften wie auch den Transport zur Zellmembran betreffend klar von der zuvor beschriebenen Mutation TRPM6-S141L. Diese wurde weder an die Oberfläche (ko-)transportiert, noch hatte sie einen Einfluss auf durch TRPM7-Kanäle generierte Ströme (Chubanov et al., 2004).

Das betroffene Prolin im TRPM6-Protein ist eine hochkonservierte Aminosäure innerhalb der TRPM-Subfamilie. Dementsprechend hatte der korrespondierende Aminosäureaustausch im nahe verwandten TRPM7-Protein (P1040R) ähnliche funktionelle Auswirkungen auf die Kanaleigenschaften wie die durch P1017R beobachteten. Durch konfokale Mikroskopie von in HEK293-Zellen exprimierten, YFP-fusionierten Proteinen konnte gezeigt werden, dass das TRPM7^{P1040R}-Protein zur Zelloberfläche transportiert wurde und dort dominant-negativ auf die Ionenströme durch TRPM7^{WT}-Kanäle wirkte. Dieses Experimente bestätigen somit die Auswirkungen der Mutation im TRPM6-Protein. Auch in anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Aminosäureaustausche im TRPM6-Protein die gleichen Auswirkungen auf die Permeationseigenschaften hervorriefen wie beim entsprechenden Austausch im TRPM7 (Li et al., 2007).

4.1.3 Klinisch-genetische Hintergründe der Krankheitsausprägung

Keine der bisher gefundenen Mutationen im TRPM6-Gen zeigte in heterozygoten Individuen eine Haploinsuffizienz, bei der bereits der Ausfall eines Allels zur Ausprägung der entsprechenden Krankheitssymptome führt. Nur ein Ausfall beider TRPM6-Allele bewirkt die Symptome der HSH. Es ist aber denkbar, dass Mutationen, die das Gen trunkieren oder die Spleißstellen betreffen, in der Expression dominant-negativer Kanaluntereinheiten resultieren. Solch eine Situation wäre ähnlich zu den Auswirkungen der P1017R-Mutation. Die genetischen und klinischen Daten in diesem Fall zeigen deutlich, dass der Vater des betroffenen Patienten, obwohl er heterozygot für die P1017R-Mutation war, einen normalen Magnesiumhaushalt besaß. Eine plausible Erklärung wäre, dass TRPM6^{P1017R} nicht in der Lage ist, die Funktion der Proteine, die durch Wildtyp-Allele produziert wurden,

komplett zu unterdrücken. Offensichtlich kann die funktionelle Rolle des TRPM6-Kanals auch durch relativ geringe Proteinmengen erhalten werden, ein Phänomen, dass häufig bei autosomal-rezessiven Krankheiten beobachtet wird (Kass, 2005; Ashcroft, 2006; Furney et al., 2006).

Um dies im Fall des TRPM6-Kanals zu überprüfen, wurden im Rahmen dieser Studien auch Versuche im Oocytensystem unternommen. Durch Proteinexpression mittels cRNA-Injektion in den Oocyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* lässt sich ein stöchiometrisches Verhältnis zwischen zwei zu exprimierenden Proteinen einhalten, da durch die Menge der injizierten cRNA die Menge des später exprimierten Proteins genau definiert ist. Diese Methode wird eingesetzt, um z.B. Heteromultimerisierungsstudien durchzuführen oder erblich bedingte Proteinverhältnisse in der Zelle nachzuvollziehen. In diesem Fall wurde das Zusammenspiel der TRPM6- und TRPM7-Proteine im heterozygoten Zustand des Vaters nachgestellt. Dazu wurden 10 ng TRPM7-cRNA und eine cRNA-Mischung der beiden TRPM6-Varianten (5 ng TRPM6^{WT} und 5 ng TRPM6^{P1017R}) in *Xenopus*-Oocyten injiziert und mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gemessen. Dabei zeigte sich, dass die Koexpression von TRPM6^{WT}-Protein ausreichte, um den dominant-negativen Effekt der Mutation aufzuheben und somit die TRPM6/7-Kanalfunktion aufrecht zu erhalten. Auf die Verhältnisse im Körper übertragen bedeutet dies, dass die Menge des durch ein Allel exprimierten Proteins ausreicht, um einen normalen Magnesiumlevel im Blut zu gewährleisten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass TRPM6^{WT}-Proteine effizienter heteromultimerisieren können als mutierte Proteine. Somit könnte die Anzahl an funktionellen Kanalkomplexen an der Zelloberfläche unterschiedlich im Vergleich zu der sein, die sich aus dem Verhältnis von TRPM6^{WT}- und TRPM6^{P1017R}-Protein im heterozygoten Zustand kalkulieren lässt. Dabei muss man sicher berücksichtigen, dass dieses Experiment eventuell nicht in der Lage ist, die Verhältnisse in nativen Zellen exakt wiederzugeben. Außerdem könnten unterschiedliche Isoformen von TRPM6- und TRPM7-Proteinen den Effekt der P107R-Mutante *in vivo* beeinträchtigen (Runnels et al., 2001; Chubanov et al., 2004). Es ist auch möglich, dass im heterozygoten Zustand die Expression beider Allele des TRPM6-Gens hochreguliert wird, so dass eine erhöhten Anzahl an funktionsfähigen Wildtyp-Heterooligomeren entsteht.

4.1.4 Funktionelle Aspekte zu TRPM6- und TRPM7-Kanälen

Unabhängig von der klinischen Relevanz ergaben die Analysen der Mutationen im TRPM6- und TRPM7-Protein interessante Ergebnisse bezüglich der Funktion dieser Proteine. So konnte gezeigt werden, dass TRPM6^{P1017R} und TRPM7^{P1040R} in der Lage waren, native, TRPM7-ähnliche, magnesiuminhibierte (MIC) Kationenströme in HEK293-Zellen zu unterdrücken. Übereinstimmend mit Daten aus RNA-Interferenz-Ansatz (*short hairpin RNA*), in dem die Expression des nativen TRPM7-Proteins unterdrückt und dadurch die Entwicklung von MIC-Strömen verhindert wurde (Su et al., 2006), unterstützen diese Ergebnisse unabhängig voneinander die Annahme, dass TRPM7-Kanalkomplexe das molekulare Korrelat endogener MIC-Kanäle sind. Allerdings bleibt immer noch ein Reststrom mit TRPM7-ähnlicher Strom-Spannungs-Beziehung zurück. Dieser könnte darauf zurückzuführen sein, dass es noch einen weiteren Kanal neben TRPM7 gibt, der an der Entwicklung von MIC-Strömen beteiligt ist. Weiterhin bestätigt der dominant-negative Effekt durch TRPM6^{P1017R} die Vermutung, dass in TRPM6/7-Heterooligomeren die Untereinheiten beider Proteine an der Bildung der Pore beteiligt sind (Chubanov et al., 2004). Drittens gibt die Analyse von HSH-Mutationen, die in verschiedenen Bereichen des TRPM6-Proteins lokalisiert sind, Aufschluss über die unterschiedlichen biologischen Rollen, die die einzelnen Abschnitte (Kanal- und Kinase-Domäne) dieses Protein spielen. Bis heute ist das funktionelle Zusammenspiel zwischen Kanal- und Kinaseaktivität in TRPM6/7-Komplexen nicht aufgeklärt. Die Analyse von TRPM6^{P1017R} zeigt, dass die Suppression der Kanalfunktion in TRPM6/7-Komplexen ausreicht, um die typischen HSH-Symptome hervorzurufen. Dieses Ergebnis stimmt überein mit der biophysikalischen Analyse von heterolog exprimierten TRPM7-Protein, dem die Kinase-Domäne fehlt oder in dem die Kinase aufgrund von Mutationen nicht aktiv ist (Schmitz et al., 2003; Matsushita et al., 2005; Demeuse et al., 2006). Diese Studien ergaben, dass die Kinase-Domäne prinzipiell nicht nötig ist, um einen funktionellen Kanal zu erhalten. Zudem wurde gezeigt, dass in TRPM7-gendefizienten DT40-Zellen heterolog überexprimiertes TRPM7^{WT}-Protein sowie eine Mutante ohne Kinase-Funktion gleich gut in der Lage waren, das entstandene Magnesium-Defizit auszugleichen und somit die Lebensfähigkeit der Zellen zu erhalten (Schmitz et al., 2003). Zusammenfassend lassen unsere Analysen der neuen HSH-Mutation und der *In-vitro*-Experimente mit TRPM7-Kanälen vermuten, dass in TRPM6/7-Kanalkomplexen die Kinaseaktivität der Kanalaktivität nachgeschaltet ist. Somit sind die hier

charakterisierten Mutanten TRPM6^{P1017R} und TRPM7^{P1040R} wertvolle Werkzeuge, um diese Hypothese zu validieren.

Es wird immer noch kontrovers diskutiert, ob TRPM6-Homomultimere in nativen Zellen funktionelle Ionenkanäle bilden können. Offensichtlich reichen kleine Variationen in der Zusammenstellung der Pipettenlösung für Ganzzellmessungen von TRPM7-Kanälen aus, um zu unterschiedlichen Ergebnissen zu kommen. In den vorgestellten Versuchen konnte keine Kanalaktivität festgestellt werden, übereinstimmend mit der intrazellulären Lokalisation des Proteins in HEK293-Zellen. Diese Resultate stimmen mit verschiedenen Berichten überein, die ebenfalls zeigen konnten, dass das TRPM6-Protein für eine effiziente Oberflächenexpression TRPM7-Protein als Heteromerisierungspartner benötigt (Chubarov et al., 2004; Schmitz et al., 2005). Die Vermutung, dass das TRPM6-Protein alleine keinen funktionellen Kanal bilden kann, steht nicht im Widerspruch dazu, dass er im TRPM6/7-Komplex als funktionelles Protein integriert ist. Unter den spannungsabhängigen Kaliumkanälen sind viele Vertreter bekannt, die alleine keinen elektrisch aktiven Kanal bilden, die aber als sogenannte „stille“ Untereinheiten in heteromultimeren Komplexen einen modulierenden Einfluss haben (Salinas et al., 1997; Kramer et al., 1998; Stocker et al., 1999; Reintanz et al., 2002; Kerschensteiner et al., 2005; Bregante et al., 2008). Innerhalb der TRP-Proteine ist die gleiche Rolle für das TRPC1-Protein denkbar, für den als homomultimeren Kanal noch keine Kanalaktivität gemessen werden konnte, der aber innerhalb des TRPC1/5-Komplexes eine Änderung der Kanaleigenschaften im Vergleich zum homomeren TRPC5-Kanal bewirkt (Strubing et al., 2001). Dem gegenüber zeigen andere Studien, dass die transiente Expression von humanem TRPM6-Protein zur Formation funktioneller Ionenkanäle führte (Voets et al., 2004b; Li et al., 2006; Li et al., 2007; Topala et al., 2007). Es ist aber erwähnenswert, dass Versuche, native Ströme aufzuzeichnen, die nur durch TRPM6-Homooligomere generiert wurden, nicht erfolgreich waren (Li et al., 2006). Man kann nicht ausschließen, dass ein *chemical chaperon* die intrazelluläre Retention des TRPM6-Proteins ausschaltet, dass also ein kleines Protein in der Zelle die korrekte Faltung des Proteins bewirkt und so den Transport an die Oberfläche ermöglicht. Demgegenüber zeigt eine steigende Zahl von Untersuchungen an Zelllinien und Geweben, dass TRPM6- und TRPM7-Proteine koexprimiert werden, wodurch sich die Frage erhärtet, ob TRPM6-Proteine *in vivo* selbstständig funktionsfähig ist. Die spezifische und effiziente

Heteromultimerisierung von TRPM6- mit TRPM7-Untereinheiten, die in vielen alternativen Expressionsmodellen bestätigt wurde, könnte die ursprüngliche Rolle des TRPM6-Proteins als eine Untereinheit im TRPM6/7-Komplex reflektieren. Dieses Szenario würde sehr gut mit der unverzichtbaren Rolle übereinstimmen, die das TRPM7-Protein in DT40-Lymphocyten einnimmt.

4.2 Porenmutanten

Die hohe Diversität der Permeationseigenschaften von TRPM-Kanälen bietet eine hervorragende Möglichkeit zum Vergleich der Struktur-Funktions-Beziehungen, um die molekularen Determinanten der kanalspezifischen Eigenarten ausfindig zu machen. Diese Befunde können zur Aufklärung der physiologischen Bedeutung der jeweiligen TRP-Proteine beitragen, die für die meisten Mitglieder dieser Proteinfamilie noch nicht vollständig erschlossen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels zielgerichteter Mutagenesen verschiedene Aminosäuren im Bereich der Pore des divalentenpermeablen TRPM7-Kanals durch die korrespondierenden Aminosäuren des monovalent selektiven TRPM2 substituiert, um mögliche Determinanten für die Divalentenpermeation zu lokalisieren. Dabei bewirkten zwei Aminosäureaustausche, E1047Q und Y1049P, bei elektrophysiologischen Ganzzellmessungen eine deutliche Reduzierung der Divalentenpermeation durch den entstehenden Kanal, so dass die Permeationseigenschaft des TRPM2-Kanals auf den TRPM7 übertragen werden konnte. In Aequorin-basierten Calciummessungen konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. In der Mutante E1047Q war die Divalentenpermeation fast vollständig verhindert. Weitere Aminosäureaustausche durch Aspartat und Asparagin an der Position 1047 zeigten, dass die negativ geladene funktionelle Gruppe des Glutamats an dieser Stelle verantwortlich für die Divalentenpermeation zu sein scheint. Der Austausch eines anderen Glutamats an Position 1052 zu Glutamin führte zu keiner bedeutenden Änderung der Permeationseigenschaften. Durch die Mutante E1047Q war außerdem der intrinsische Block des TRPM7-Kanals durch extrazelluläre Magnesiumionen stark beeinträchtigt, nicht jedoch der durch intrazelluläres Magnesium. Die gegenteiligen Mutationen im TRPM2- und zum Teil auch im TRPM8-Protein konnten die umgekehrten Effekte bezüglich der Divalentenpermeation in diesen Kanälen bewirken und somit diesen Kanälen die Eigenschaft des TRPM7-Kanals zur erhöhten Divalentenpermeation übertragen.

4.2.1 Divalentenpermeation in TRP-Kanälen

Die aus den generierten Mutationen entstandenen Proteine wurden mit verschiedenen 10 mM Divalentenlösungen auf ihre Fähigkeit zur Divalentenpermeation untersucht. Bei Betrachtung der Permeabilitäten des Wildtyps fiel auf, dass für die untersuchten divalenten Ionen andere Präferenzen als die üblicherweise angenommenen gefunden wurden. Während Monteilh-Zoller et al. (2003) eine höhere Präferenz für Barium- statt für Magnesium- und Calciumionen fanden, war in den hier vorgestellten Messungen Barium das am wenigsten permeable Ion unter den dreien. Zudem waren die hier gefundenen Permeabilitäten für Magnesium und Calcium annähernd gleich, während in der genannten Arbeit eine bessere Permeation von Magnesiumionen im Vergleich zu Calciumionen gefunden wurde. Auch dort wurden 10 mM Divalentenlösungen verwendet, allerdings war die Basis dieser Divalentenlösungen eine Ringerlösung, also eine physiologische Lösung mit verschiedenen monovalenten Ionen wie Natrium und Kalium. Zudem gab es Versuche, in denen isotone Divalentenlösungen mit einer Konzentration von 120 mM des gewünschten Kations verwendet wurden und mit denen die gleichen Abstufungen in der Divalentenpermeation gefunden wurden. Diese Lösungen bergen allerdings die Gefahr, dass durch die hohe Anzahl an Ladungen in der Lösung sterische Veränderungen in dem zu untersuchenden Protein hervorgerufen werden. Mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass der TRPM7-Kanal unter physiologischen Bedingungen auch Natriumionen leiten kann, so dass auch die Lösungszusammensetzung auf Basis einer Ringerlösung nicht gut gewählt ist. Somit erscheint die in der vorliegenden Arbeit gewählte Kombination aus NMDG-Chlorid und 10 mM des gewünschten divalenten Kations als geeigneter und die gewonnenen Ergebnisse könnten somit die realen Verhältnisse in der Divalentenpermeation besser widerspiegeln.

Zwei der generierten Mutanten verursachten enorme Linksverschiebungen der Umkehrpotentiale. Die daraus ermittelten Permeabilitäten zeigten, dass die Mutante TRPM7^{Y1049P} fast keine Präferenz für divalente Kationen gegenüber Natriumionen aufwies ($P_{div}/P_{Na} = 1-3,5$). Die Mutante TRPM7^{E1047Q} hatte die Fähigkeit zur Divalentenpermeation fast völlig verloren, die errechneten Permeabilitäten im Vergleich zu Natrium betrugen 0,32; 0,27 und 0,37 für Calcium-, Magnesium- und Bariumionen. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass mit Annäherung der Position der generierten Aminosäureaustausche an die Position 1047 immer stärkere

Auswirkungen auf die Permeabilitäten erkennbar waren. Bei Betrachtung eines dreidimensionalen Modells, das auf Basis der Kristallstruktur eines spannungsabhängigen Kaliumkanals aus dem Archaeobakterium *Aeropyrum pernix* erstellt wurde, zeigt sich, dass die Aminosäuren Glutamat 1047 und Tyrosin 1049 sich im Bereich der putativen Porenschleife zwischen den Transmembrandomänen fünf und sechs befinden. Somit besteht die Möglichkeit, dass sie in direktem Kontakt mit vorbeiströmenden Ionen stehen (Daten nicht gezeigt). Diese Stelle innerhalb der Pore scheint also einen besonders sensitiven Punkt für die Ionenpermeation darzustellen.

Neben der verringerten Divalentenpermeation zeigten die Strom-Spannungs-Beziehungen der beiden genannten mutierten Kanäle prominente Einwärtsströme, die nur auf monovalenten Kationenströmen beruhen konnten. Die mutierten Kanäle näherten sich also in ihren Permeationseigenschaften dem TRPM2-Kanal an, der hauptsächlich für monovalente Kationen permeabel ist. Die Doppelmutante aus beiden Aminosäureaustauschen zeigte sogar eine Strom-Spannungs-Beziehung, die in bemerkenswertem Maße der des TRPM2-Kanals ähnelte.

Negativ geladene Aminosäurereste wurden schon in verschiedenen Arbeiten als involviert in die Permeationseigenschaften von TRP-Kanälen charakterisiert, speziell in die für divalente Kationen. Übereinstimmend mit den hier vorgestellten Ergebnissen konnten Nilius et al. beim TRPM4-Kanal nach der Substitution von Glutamin 977 - der entsprechenden Aminosäure zum Glutamat 1047 im TRPM7-Protein - durch Glutamat eine moderate Calcium-Permeabilität des normalerweise völlig Calcium-impermeablen Kanals zeigen (Nilius et al., 2005a). Arbeiten mit anderen TRP-Kanälen belegen ebenfalls die Bedeutung negativ geladener Aminosäuren für die Divalentenpermeation. So konnte dieselbe Arbeitsgruppe zeigen, dass ein Aspartat im TRPV5- und TRPV6-Protein für die hohe Calciumselektivität dieser Kanäle verantwortlich ist, die durch das Einfügen eines Alanins an dieser Stelle beeinträchtigt wurde (Nilius et al., 2001). Diese Kanäle weisen als Wildtyp zudem wie der TRPM7 einen Block durch extrazelluläre Magnesiumionen auf, welcher in der generierten Mutante ebenfalls gestört war, wiederum in Übereinstimmung zu den hier gefundenen Auswirkungen nach Entfernung eines negativen Aminosäurerestes. Auch im TRPV1- und TRPV4-Protein ist jeweils ein Aspartat für die Divalentenpermeation verantwortlich (Garcia-Martinez et al., 2000; Voets et al., 2002). Zwei Glutamate im TRPC5-Protein waren ebenfalls

relevant für die Permeationseigenschaften des Kanals, allerdings führte die simultane Substitution durch Glutamine hier erstaunlicherweise zu einem Anstieg in der Calciumpermeabilität (Jung et al., 2003). In einer kürzlich vorgestellten Studie konnte am TRP-Kanal von *Drosophila melanogaster* erstmals *in vivo* nachgewiesen werden, dass die Mutation eines Aspartats zu Asparagin bzw. Glycin die Calciumpermeation durch den Kanal behinderte. Diese beiden Mutanten, nicht aber der Austausch zu Glutamat, beeinträchtigten nachfolgend die Reaktion auf Lichtreize und führten zu einer lichtabhängigen, retinalen Degeneration (Liu et al., 2007). Dies sind die ersten Beobachtungen über die Auswirkungen einer beeinträchtigten Divalentenpermeation auf physiologische Mechanismen.

Parallel zu den hier vorgestellten Versuchen veröffentlichte eine weitere Arbeitsgruppe ihre Ergebnisse zu Untersuchungen an der Mutante E1047Q im TRPM7-Protein (Li et al., 2007). Übereinstimmend mit den Daten der vorliegenden Arbeit konnte in dem mutierten Kanal so gut wie keine Calcium- und Magnesiumpermeation mehr gefunden werden. Auch die Strom-Spannungs-Beziehung der Mutante deckt sich mit der hier ermittelten, sie zeigte deutliche Einwärtsströme und eine verringerte Steigung bei leicht positiven Potentialen. In jener Arbeit wurde jedoch nicht die Bedeutung des Tyrosins an Position 1049 erkannt, welches in der vorliegenden Arbeit einen Anteil am Selektivitätsfilter des TRPM7-Kanals hat und sogar additive Effekte zusammen mit der Mutante TRPM7^{E1047Q} aufwies. Für Kaliumkanäle wurde gezeigt, dass die Porenschleife ein unveränderliches Tyrosin beinhaltet, das in eine spezifische Interaktion mit einem aromatischen Aminosäurerest innerhalb der Porenhelix tritt. Dabei können die Carbonylgruppen des Tyrosins mit den permeierenden Kationen interagieren (Jiang et al., 2003; Shi et al., 2006). Für das Tyrosin 1049 im TRPM7-Protein wäre eine ähnliche Rolle denkbar.

In der Studie von Li et al. (2007) lag ein weiterer Fokus auf einem zweiten Glutamat in der Porenregion an Position 1052. Der Austausch dieses Glutamats durch Glutamin resultierte ebenfalls in einer gestörten Divalentenpermeation und erhöhten Einwärtsströmen durch den entstandenen Kanal. Es wurde postuliert, dass das Glutamat 1052 zusammen mit dem Glutamat 1047 den Selektivitätsfilter des TRPM7-Kanals bildet. Obwohl der gleiche Aminosäureaustausch auch für die hier vorgestellten Untersuchungen generiert wurde, können diese Aussagen durch die hier gewonnenen Ergebnisse nicht bestätigt werden. Die genannte Mutation

resultierte in unseren Händen in einem unauffälligen Kanal mit zwar leicht reduzierter Permeabilität für divalente Kationen, aber einer zum Wildtyp identischen Strom-Spannungs-Beziehung. Li et al. (2007) stellten fest, dass das Glutamat 1047 auch für die pH-Sensitivität des Kanals verantwortlich sein soll und konnten zudem zeigen, dass die korrespondierenden Aminosäureaustausche im TRPM6-Protein zu den gleichen Ergebnissen führten. Für das Glutamat an Position 1024, welches dem E1047 im TRPM7-Protein entspricht, konnten auch Topala et al. eine wichtige Rolle in Bezug auf die Permeationseigenschaften finden (Topala et al., 2007).

4.2.1.1 Reziproke Aminosäureaustausche im TRPM2- und TRPM8-Protein

Anders als in den früheren Studien konnte die vorliegende Arbeit durch die Einführung der reziproken Aminosäureaustausche im TRPM2- und im TRPM8-Protein erstmals die Allgemeingültigkeit der getroffenen Aussagen über die Bedeutung bestimmter Aminosäuren in der Divalentenpermeation belegen. Durch die Einführung negativ geladener Aminosäuren im "QIP"-Motiv des TRPM2-Proteins ("EVY" in TRPM7-Protein) konnte eine deutliche Änderung der Permeationseigenschaften hervorgerufen werden. Dabei zeigte die Doppelmutante eine weit höhere Verbesserung der Permeation von divalenten Kationen als jede der Einzelmutanten.

Es wurde jedoch festgestellt, dass der TRPM8-Kanal mit dem Prolin zu Tyrosin Austausch und auch mit der Doppelmutante Q914E/P916Y nicht funktionell waren. Es lässt sich nur mutmaßen, dass es durch diese Mutationen zu einer so starken Konformationsänderung im Bereich der Pore kommt, dass der Kanal nicht mehr in der Lage ist, Ionen zu leiten. Die Einzelmutante Q914E zeigte jedoch eine deutliche Zunahme in der Divalentenpermeation, die in Aequorin-basierten Messungen bestätigt werden konnte.

Die gewonnenen Daten lassen somit vermuten, dass zwei Mutationen in diesem Motiv ausreichend sind, um den in hohem Maße für Calcium permeablen TRPM7- und den nichtselektiven TRPM2-Kanal in funktionelle Kanäle mit völlig entgegengesetzten Eigenschaften zu verwandeln. Dabei könnte das Glutamat 1047 des TRPM7-Proteins im heteromeren Kanal einen Ring negativer Ladungen um die Pore formen, der eine Affinität zu den divalenten Kationen der Lösung ausbildet und eine Bindung derselben ermöglichen könnte. Bei Entfernen der negativen Ladung durch Einführen eines Glutamins geht diese Bindungsstelle verloren und es kommt zu einer verringerten Divalentenpermeation. Dies wurde für TRP-Kanäle schon in

mehreren anderen Arbeiten zu den Permeationseigenschaften vermutet (Garcia-Martinez et al., 2000; Nilius et al., 2001; Jung et al., 2003; Voets et al., 2004a; Liu et al., 2007). In diesen Studien ist zu erkennen, dass die für die Permeationseigenschaften verantwortlichen Aminosäuren sich immer im Bereich der Porenhelix oder der Porenschleife befinden, auch wenn die gefundenen Selektivitätsfilter zum Teil jeweils um einige Aminosäuren verschoben sind. Somit geben trotz teils unterschiedlicher Ergebnisse all diese Arbeiten wertvolle Anhaltspunkte, an denen sich weitere Studien orientieren können.

4.2.2 Weitere Glutamat- und Tyrosin-Mutationen

Im Rahmen der Untersuchungen zum Glutamat an Position 1047 wurde diese Aminosäure durch verschiedene andere Aminosäuren ersetzt. Dabei wurden Aminosäuren gewählt, in denen die Länge der Seitenkette verkürzt (Aspartat) bzw. in der zusätzlich die negativ geladene Gruppe nicht vorhanden war (Asparagin). Es zeigte sich, dass der Austausch zu Aspartat bereits leichte Beeinträchtigungen in der Kanalfunktion verursachten, dass aber die größten Effekte durch Entfernen der negativen Gruppe der Seitenkette erreicht wurden. Die Mutante TRPM7^{E1047N} ähnelte im Permeationsverhalten sowie in der Strom-Spannungs-Beziehung in hohem Maße der ursprünglich generierten Mutante TRPM7^{E1047Q}.

Ähnliche Versuche finden sich in der Arbeit von Nilius et al. (2001): Auch diese Gruppe variierte die Länge der Seitenketten bei dem analysierten Aspartat. Sie fand, dass es nicht ausschließlich auf die Art der funktionellen Gruppe ankam, sondern auch auf ihre Entfernung zum Porencentrum (Nilius et al., 2001). Allerdings stellte man dort durch eine Verlängerung der Seitenketten vermutlich aufgrund sterischer Effekte einen völligen Verlust in der Calciumpermeation fest. Die Mutationen bewirkten dort somit weit stärkere Auswirkungen als in der hier vorliegenden Arbeit, wo nur moderate Einbußen in der Divalentenpermeabilität und leicht veränderte Strom-Spannungs-Beziehungen beobachtet wurden.

Für das Tyrosin an Position 1049 zeigte sich, dass die funktionelle Gruppe keine Relevanz für die Divalentenpermeation zu haben scheint, hier könnte dagegen der aromatische Ring der Seitenkette eine Rolle spielen.

4.2.3 Inhibition der TRPM7-Kanalaktivität durch Magnesiumionen

Durch Vergleiche der Stromhöhen bei Messungen mit verschiedenen Magnesiumkonzentrationen in der intra- bzw. extrazellulären Lösung konnte gezeigt werden, dass in der Mutante TRPM7^{E1047Q} der Block der Kanalaktivität durch extrazelluläre Magnesiumionen fast völlig eliminiert war. Bei einer extrazellulären Magnesiumkonzentration von 20 mM, die beim TRPM7^{WT}-Kanal zu einem fast vollständigen Block mit durchschnittlich 95% Stromreduzierung im Vergleich zu magnesiumfreier Lösung führte, konnte im mutierten Kanal nur noch eine mittlere Stromreduzierung von etwa 18% beobachtet werden. Der Block durch intrazelluläres Magnesium dagegen war nicht beeinträchtigt. Diese Ergebnisse konnten durch Li et al. (2007) bestätigt werden, auch dort wurde festgestellt, dass in dieser Mutante der Block durch extrazelluläres Magnesium massiv gestört war, der Block durch intrazelluläres Magnesium blieb hingegen unbeeinträchtigt. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass das Glutamat an Position 1047 zum Äußeren der Zelle gerichtet ist, so dass Magnesiumionen binden und die Kanalaktivität inhibieren können. Dabei ist das Glutamat so positioniert, dass es dabei nicht von innen erreicht werden kann.

Die Ergebnisse in Bezug auf die Aspartat- und Asparagin-Mutation zeigen, dass auch für den Block durch extrazelluläre Magnesiumionen die negativ geladene Seitenkette des Glutamats 1047 verantwortlich zu sein scheint. Die Mutation E1047N zeigte einen ähnlich starken Verlust des Blockes wie E1047Q, während es in der E1047D-Mutante noch zu einer deutlichen Stromreduktion kam. Das Glutamat an Position 1052 scheint auch für den Block durch extrazelluläre Magnesiumionen, wie für die Permeationseigenschaften, kaum Bedeutung zu haben, es kam zu einer ähnlich starken Stromreduzierung wie beim TRPM7^{WT}-Kanal.

4.2.3.1 Bindungsstellen für intrazelluläres Magnesium

Bei den Messungen zur Inhibierung der Kanalaktivität durch intrazelluläres Magnesium fiel auf, dass ein Wert aus der erstellten Ausgleichskurve herausfiel. Nachträgliche Messungen mit weiteren Magnesiumkonzentrationen enthüllten eine zweite Plateauphase. Dies ist ein erster Beweis für die These, dass es mindestens zwei intrazelluläre Magnesium-Bindungsstellen, eine hoch- und eine niederaffine, im TRPM7-Kanal gibt. Kerschbaum und Kollegen vermuteten nach ihren Analysen auf Basis der Eyring-Theorie sogar drei intrazelluläre Magnesium-Bindungsstellen, eine

hoch- und zwei niederaffine (Kerschbaum et al., 2003). Die Eyring-Theorie stellt die Membran als eine Barriere mit verschiedenen Energieniveaus dar, die durch die permeierenden Kationen überwunden werden muss. Li et al. (2007) fanden, ebenfalls mittels des Eyring-Modells, dass es nach der Zerstörung der hochaffinen Bindungsstelle, die E1047 beinhaltet, nur noch eine niederaffine Bindungsstelle geben müsse (Li et al., 2007; Topala et al., 2007). Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten legen ebenfalls nahe, dass es sich um zwei Bindungsstellen für intrazelluläres Magnesium handelt.

4.2.4 Versuchsbedingungen

Gegenüber der üblicherweise durchgeführten konsequenten Substitution der zu untersuchenden Aminosäuren durch das neutrale Alanin bietet die Vorgehensweise einer gezielten Mutagenese den Vorteil, dass seltener mit einem vollständigem Funktionsverlust der entstehenden Proteine zu rechnen ist. Beim Austausch zu Alanin werden vorher an dieser Position vorhandene Seitenketten vollständig entfernt. Allerdings besteht gerade bei Mutationen im Bereich einer Porenstruktur eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass das mutierte Protein durch diesen extremen Eingriff nicht mehr funktionell ist. So lassen sich zwar Aussagen über die Relevanz einer Aminosäure treffen, nicht aber über ihre Funktion. In der Literatur lassen sich demnach nicht viele Studien finden, die auf Substitutionen durch Alanin basieren und die Permeationseigenschaften eines Kanals im Fokus haben (Grunder et al., 1999; Maruoka et al., 2002). Topala et al. (2007) tauschten im Rahmen von Permeationsstudien im TRPM6-Protein mehrere Aminosäuren zu Alaninen und fanden in vier von fünf Fällen die resultierenden Proteine als nicht funktionell. Auch eine initial für die vorliegende Versuchsreihe durchgeführte Mutation, D1054A, zeigte keine Kanalaktivität (Daten nicht gezeigt). Zudem lassen sich durch gezielte Mutationen geringere Manipulationen bewirken und somit auch exaktere Aussagen bezüglich bestimmter Eigenschaften der mutierten Aminosäuren treffen.

In den hier durchgeführten Mutagenesen waren keine großen Funktionsverluste zu befürchten, da die eingefügten Aminosäuren in anderen, nahe verwandten Proteinen an dieser Position funktionell sind. So war von den sieben in dieser Arbeit durchgeführten Aminosäureaustausche tatsächlich nur eine Mutante, M1043T, kaum funktionell, wobei auch diese noch zu einer Modulation des typischen TRPM7-Stroms in der Lage war. Alle anderen Mutationen resultierten in funktionsfähigen

Proteinen, die zwar Unterschiede in den Stromhöhen aufwiesen, aber zu einer deutlichen Stromentwicklung in der Lage waren.

Aufgrund des Blocks der TRPM7-Kanalaktivität durch intrazelluläre Magnesiumionen wurde eine magnesiumfreie Pipettenlösung verwendet, um maximale TRPM7-Ströme zu induzieren. Für die Untersuchung der generierten Mutanten bezüglich der Fähigkeiten zur Divalentenpermeation wurde ein möglichst impermeables monovalentes Kation als Basis für die verwendeten Lösungen benötigt, damit die jeweiligen divalenten Kationen die einzigen permeierenden Ionen waren. In Vorversuchen wurde N-methyl-D-Glucamin-Ionen (NMDG^+) als kaum permeabel gefunden, sie wurden weniger gut geleitet als Cholin- oder Natrium-Ionen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu früheren Berichten, in denen postuliert wurde, dass Cholin ein nicht permeables Kation sei (Nadler et al., 2001). Allerdings lag diesen Versuchen eine andere, weniger physiologische Lösungszusammensetzung mit 10 mM Calcium und 2 mM Magnesium zugrunde, was für die gefundenen Diskrepanzen verantwortlich sein könnte. In derselben Arbeit wird postuliert, dass der TRPM7-Kanal unter physiologischen Bedingungen nicht durchlässig für Natrium ist. In den hier vorliegenden Versuchen konnte aber eine deutliche Permeation von Natriumionen gefunden werden, die relativen Ströme waren um ein Drittel höher als bei einer vergleichbaren Lösung auf der Basis von NMDG-Chlorid.

4.2.4.1 Aequorinmessungen

Die Calciummessungen auf Basis der Biolumineszenz von Aequorin boten eine gute Möglichkeit, das Verhalten der mutierten Proteine unter physiologischeren Bedingungen als in *patch clamp*-Messungen zu analysieren. Mangels passender Agonisten wurde der TRPM7-Kanal auf anderem Wege aktiviert, um eine Calciumantwort in den Aequorinmessungen zu erhalten. Es wurde ein Sprung in der Konzentration des extrazellulären Calciums bewirkt, der bei dem konstitutiv offenen TRPM7-Kanal zum erhöhten Influx von Calciumionen führte. Des weiteren wurde eine HBS-Lösung ohne Magnesium angesetzt, um die Aktivität des TRPM7-Kanals nicht zu hemmen. Der Block durch extrazelluläre Magnesiumionen scheint unter physiologischen intrazellulären Bedingungen allerdings stärker ausgeprägt zu sein als bei *In-vitro*-Versuchen, da in diesem Fall schon 1 mM extrazelluläres Magnesium reichte, um eine Aktivität des Kanals zu verhindern, während bei *patch clamp*-Messungen erst bei einer Konzentration von 5 mM extrazellulärem Magnesium eine 90% Stromreduktion erreicht wurde.

Bei den Messungen mittels Aequorin-Biolumineszenz besteht die Problematik, dass es keine Sicherheit dafür gibt, dass jede Zelle sowohl ein eGFP-Aequorin- als auch ein Plasmid mit dem Kanalgen aufgenommen hat. Dabei gilt es aber zu bedenken, dass es sich um eine kontinuierliche Ungenauigkeit in den Messungen handelt, die bei allen Transfektionen einer Datenreihe gleichermaßen besteht, so dass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet bleibt. Bei der Deutlichkeit der Aussagen, die hier bezüglich der Calciumantworten getroffen werden konnten, ist diesem Fehler zudem nur eine untergeordnete Rolle zuzuordnen.

4.2.5 Evolutionäre Hintergründe der Struktur und Permeabilität von TRPM-Kanälen

Während phylogenetische Analysen lange Zeit auf wenige Vertebraten sowie die Modellorganismen *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* beschränkt waren, ergeben sich durch die täglich wachsende Zahl der im Netz verfügbaren Sequenzen neue Möglichkeiten, nach den evolutionären Hintergründen der Entwicklung bestimmter Strukturen oder Eigenschaften zu forschen.

In dieser Arbeit konnte bei Proteinsequenzen aus diversen Spezies eine Verwandtschaft zu TRPM-Proteinen festgestellt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass nur Säugetiere alle acht TRPM-Proteine aufweisen. Einfachere Vertebraten besitzen lediglich TRPM2- und TRPM3-Proteine und in Spezies, die nicht mehr zu den Bilateria gehören, nur noch TRPM2-ähnliche Proteine. Im Gegensatz zu Saito und Shingai (2006) konnten in der vorliegenden Arbeit auch TRPM-Kanäle in einem Tunicaten identifiziert werden, womöglich aufgrund einer höheren Anzahl von verfügbaren Sequenzen zum heutigen Zeitpunkt (Saito und Shingai, 2006). Aufgrund dessen lag vermutlich auch der von Saito und Shingai postulierte Zeitpunkt der Entwicklung von TRPM-Proteinen erst nach Abspaltung der Vertebraten von den Urchordaten und somit weit später als der hier angenommene. Allerdings fand auch die genannte Studie, dass sich in Vertebraten die TRPM2-Proteine als erste TRPMs entwickelt haben müssen. Es muss also bedacht werden, dass viele der Genome noch nicht vollständig sequenziert sind und sich in neuen Sequenzen somit noch weitere TRPM-Proteine finden lassen könnten. Allerdings lässt die Einheitlichkeit der vorgestellten Daten dies nicht vermuten.

Es wurde bisher immer davon ausgegangen, dass ein TRPM3-ähnlicher Kanal ohne Enzymdomäne den ursprünglichen TRPM-Kanal darstellt und dass nur einzelne

Proteine nachträglich mit einer Enzymdomäne fusionierten. Durch die hier vorgestellten phylogenetischen Studien können überzeugende Argumente geliefert werden, dass ein TRPM2-ähnlicher Kanal mit einer Nudix-Domäne den ursprünglichen Typ darstellt. Die Tatsache, dass auch in dem vollständig sequenzierten, einzelligen Flagellaten *Monosiga brevicollis* ein TRPM2-ähnliches Protein gefunden wurde, lässt dabei die Ursprünglichkeit von TRPM-Proteinen erahnen (King et al., 2008). Unter der Annahme, dass sowohl Säugetiere als auch die Protistengruppe der Flagellaten von einem gemeinsamen einzelligen Vorfahren abstammen, könnten TRPM2-ähnliche Gene eine Milliarde Jahre alt sein. Im Laufe der Evolution kam es dann zum Verlust der Nudix-Domäne und teilweise zu einer erneuten Fusion mit einer Kinase-Domäne. Interessanterweise besitzen die Ecdysozoa *D. melanogaster* und *C. elegans* keine Nudix-fusionierten TRPM-Proteine, dafür aber NUDT9-Proteine ohne Transmembrandomäne. Dies mag ein Hinweis darauf sein, dass es bei dieser Entwicklungsstufe zu einer Abspaltung der Nudix-Domäne kam.

Neben der Nudix-Domäne am C-Terminus der Proteine war auch die porenbildende Region evolutionären Veränderungen unterworfen. Das in dieser Studie untersuchte Glutamat 1047 im TRPM7 ist innerhalb der TRPM-Subfamilie hoch konserviert, es ist auch schon in den ursprünglichen TRPM2-ähnlichen Proteinen von *Monosiga brevicollis* zu finden. Anstelle des Tyrosins an Position 1049 findet sich bei all diesen Spezies ein Phenylalanin, was aber vermutlich keine Auswirkungen auf die Permeationseigenschaften hat, wie die vorgestellten Daten zum Tyrosin-Phenylalanin-Austausch zeigen konnten. Der Austausch des ‚EVY‘-Motivs durch das ‚QIP‘-Motiv hat jedoch grundlegende Änderungen der Permeationseigenschaften zufolge, indem die Divalentenpermeation stark reduziert wird. Somit führte der evolutionäre Wechsel der beiden Motive zu einer Vergrößerung der Vielfalt der Permeationseigenschaften von TRPM-Kanälen und war somit vermutlich in der natürlichen Selektion begünstigt. Die gewonnenen Einblicke, die durch die hier vorgestellten Ergebnisse erlangt wurden, lassen es möglich erscheinen, allein aufgrund von Aminosäuresequenz-Analysen die Permeationseigenschaften dieser noch nicht charakterisierten, frühen TRPM-Proteine einzuschätzen. Aufgrund dessen wird hier postuliert, dass das ursprüngliche TRPM2-ähnliche Protein mit dem ‚EVY‘-Motiv einen Calcium-permeablen Kanal bildet. Die deutlichen Ergebnisse der reziproken Aminosäureaustausche im TRPM2- und TRPM8-Protein zeigen, dass solch ein Postulat

nach Analyse der entsprechenden Proteine durchaus Bestand haben könnte. In der Literatur finden sich bereits Hinweise, die diese Annahme unterstützen. Zum einen wurden in Epithelzellen von *Caenorhabditis elegans* calciumselektive, auswärts-rectifizierende Calciumströme (I_{ORCa}) beschrieben, die bezüglich ihrer Strom-Spannungs-Beziehungen und ihrer Magnesiumabhängigkeit TRPM3- und TRPM7-Kanälen ähneln. Zudem zeigen jüngere Daten, dass Gon-2 das molekulare Substrat für ORCa-Ströme in *C. elegans* sein könnten (Estevez et al., 2003; Teramoto et al., 2005). Zweitens wurde in Oocyten des Tunikaten *Ciona intestinalis* ein ADP-Ribose-abhängiger Fertilisationskanal gefunden, der eine hohe Calciumpermeabilität aufweist und dessen Strom-Spannungs-Beziehung in hohem Maße der hier vorgestellten Doppelmutante TRPM2^{Q981E/P983Y} gleicht (Wilding et al., 1998).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypocalciämie (HSH) ist ein Krankheitsbild, das sich durch Muskelkrämpfe und neurologische Schädigungen aufgrund des Magnesiummangels äußert. Verschiedene Punktmutationen im Gen des TRPM6-Proteins werden als Ursache für die Ausprägung von HSH angesehen. Mit dem TRPM6 ist der erste TRP-Kationenkanal identifiziert worden, der im Darm und in der Niere des Menschen für die Magnesiumaufnahme verantwortlich ist. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine neue, in einem HSH-Patienten gefundene Mutation in der putativen Porenregion des TRPM6 (P1017R) analysiert. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Mutanten, die nicht als funktionsfähiges Protein die Plasmamembran erreichen, konnte das TRPM6^{P1017R}-Protein bei Koexpression mit TRPM7 in der Zellmembran lokalisiert werden. Die Analyse der TRPM6^{P1017R}-Variante in Anwesenheit des zur Bildung von funktionalen Kanalkomplexen notwendigen TRPM7-Proteins zeigte, dass die entstehenden heteromeren Komplexe nicht in der Lage waren, detektierbare Ströme zu leiten. Weiterhin zeigte diese TRPM6-Mutante sowohl eine dominant-negative Wirkung auf die Funktion von heterolog exprimiertem TRPM7 als auch auf die in HEK293-Zellen endogen vorkommenden Kationenströme. Da der entsprechende Aminosäureaustausch im TRPM7-Protein die gleichen Auswirkungen in noch stärkerem Maße verursachte, kann dem Prolin an Position P1017 eine hohe Bedeutung in der Kanalpore von TRPM6- und TRPM7-Kanälen zugeordnet werden, da es für die Aufrechterhaltung ihrer physiologischen Funktion unentbehrlich zu sein scheint.

Weiterhin sollten durch zielgerichtete Mutagenesen in der Porenregion des divalent selektiven TRPM7- sowie des nichtselektiven TRPM2-Kanals Aufschlüsse über die molekularen Hintergründe der Permeationseigenschaften der TRPM-Subfamilie erlangt werden. Nach Substitution des Glutamats an Position 1047 durch ein Glutamin konnte die Divalentenpermeation des TRPM7-Kanals fast vollständig eliminiert werden. Gleichzeitig wurde durch diese Mutation die Inhibition der Kanalaktivität durch extrazelluläre, nicht aber die durch intrazelluläre Magnesiumionen beeinträchtigt. Zusammen mit einem weiteren Austausch eines Tyrosins zu Prolin (E1047Q/Y1049P) ergab sich eine Strom-Spannungs-Beziehung, die in hohem Maße der des TRPM2-Kanals ähnelt. Im Einklang mit diesen Beobachtungen zeigte die reziproke Doppelmutante im TRPM2-Protein im Vergleich zum Wildtyp eine stark erhöhte Permeation von divalenten Kationen. Somit konnten in dieser Arbeit zwei Positionen im Bereich der Pore der TRPM-Proteine identifiziert werden, die die Permeabilität dieser Kanalfamilie für divalente Kationen determinieren. Zusätzlich lassen phylogenetischen Analysen vermuten, dass diese beiden Aminosäuren und somit vermutlich auch die speziellen Permeationseigenschaften der Kanäle in einem evolutionären Prozess unterworfen waren. Dabei scheint der ursprüngliche TRPM-Kanal ein calciumpermeabler, TRPM2-ähnlicher Kanal mit einer NUDT9-ähnlichen Domäne und dem 'EVY'-Motiv gewesen zu sein. Das 'QIP'-Motiv taucht erst in später abgeleiteten Spezies auf. Der humane TRPM2 ist somit ein 'alter' Kanal mit einer 'modernen' Pore.

Zusammenfassend gibt diese Arbeit wertvolle Aufschlüsse über die Struktur-Funktions-Beziehung der Permeationseigenschaften von Kationenkanälen, die in einem phylogenetischen Kontext auch theoretische Rückschlüsse zur evolutionären Entwicklung der Porendomänen in TRP-Proteinen zulassen.

SUMMARY

Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia (HSH) is characterized by generalized convulsions and neurological damage due to the lack of magnesium. Several point mutations in the TRPM6 gene have been found to be responsible for the development of the disease. Thus, TRPM6 is the first member of the TRPM channel subfamily to be involved in magnesium reabsorption in the human intestine and kidney. In the present study, a new mutation found in a patient with HSH (P1017R) was analyzed. In contrast to other mutations, which were not able to reach the cell surface, the TRPM6^{P1017R} protein was localized in the cell membrane after coexpression with TRPM7. Measurements of TRPM6^{P1017R} in the presence of TRPM7, which is necessary for the formation of functional channel complexes, revealed that the heteromeric channels containing the mutant protein were not capable of generating any currents. P1017R even suppressed the current of the heterologously expressed TRPM7 protein, as well as endogenous cation currents in HEK293 cells, thus exhibiting a dominant negative effect. As the homologous mutation in TRPM7 (P1040R) decreased currents to an even higher degree, it can be concluded that this proline plays an important role in the pore of TRPM6 and TRPM7, and is essential for their physiological role.

Further studies focussed on the generation of pore mutants to gain insight into the molecular background determining divalent permeation properties in the TRPM subfamily. By performing site directed mutagenesis, single amino acids of the divalent selective TRPM7 channel were exchanged for the corresponding amino acids of the non selective TRPM2. The substitution of glutamate 1047 by glutamine almost abolished divalent permeation through the TRPM7 channel. At the same time, the inhibition of channel activity by extracellular, but not intracellular magnesium ions was profoundly affected. The additional substitution of a proline for a tyrosine (E1047Q/Y1049P) resulted in a current voltage relationship which strongly resembled that of TRPM2. In line with this observation, the reciprocal exchange of both amino acids in TRPM2 to those from TRPM7 resulted in a higher permeation of divalent cations. Hence, we identified two residues in the pore region that determine divalent cation permeability in the TRPM subfamily. In addition, a phylogenetic analysis revealed that these two amino acids and together with them the permeation properties of TRPM channels have changed during evolution. The ancestral TRPM channel was a calcium-permeable, TRPM2-like protein with a NUDT9-like domain and the 'EVY'-motif. The 'QIP'-motif only appeared in more recent species. Therefore, human TRPM2 is an ancient channel with a 'modern' pore.

In conclusion, the present study offers valuable clues to the relationship between structure and permeation properties in cation channels. In a phylogenetic context, these results allow conclusions about the evolution of the pore region in TRPM proteins.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ame, J. C., Spenlehauer, C., und de Murcia, G. (2004). **The PARP superfamily**. *Bioessays* 26, 882-893.
- Anast, C. S., Mohs, J. M., Kaplan, S. L., und Burns, T. W. (1972). **Evidence for parathyroid failure in magnesium deficiency**. *Science* 177, 606-608.
- Ashcroft, F. M. (2006). **From molecule to malady**. *Nature* 440, 440-447.
- Bandell, M., Macpherson, L. J., und Patapoutian, A. (2007). **From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs**. *Curr Opin Neurobiol* 17, 490-497.
- Bengele, H. H., Alexander, E. A., und Lechene, C. P. (1980). **Calcium and magnesium transport along the inner medullary collecting duct of the rat**. *Am J Physiol* 239, F24-29.
- Bessac, B. F., und Fleig, A. (2007). **TRPM7 channel is sensitive to osmotic gradients in human kidney cells**. *J Physiol* 582, 1073-1086.
- Blanchard, A., Jeunemaitre, X., Coudol, P., Dechaux, M., Froissart, M., May, A., Demontis, R., Fournier, A., Paillard, M., und Houillier, P. (2001). **Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle**. *Kidney Int* 59, 2206-2215.
- Blumberg, D., Bonetti, A., Jacomella, V., Capillo, S., Truttmann, A. C., Luthy, C. M., Colombo, J. P., und Bianchetti, M. G. (1998). **Free circulating magnesium and renal magnesium handling during acute metabolic acidosis in humans**. *Am J Nephrol* 18, 233-236.
- Brannan, P. G., Vergne-Marini, P., Pak, C. Y., Hull, A. R., und Fordtran, J. S. (1976). **Magnesium absorption in the human small intestine. Results in normal subjects, patients with chronic renal disease, and patients with absorptive hypercalciuria**. *J Clin Invest* 57, 1412-1418.
- Bregante, M., Yang, Y., Formentin, E., Carpaneto, A., Schroeder, J. I., Gambale, F., Lo Schiavo, F., und Costa, A. (2008). **KDC1, a carrot Shaker-like potassium channel, reveals its role as a silent regulatory subunit when expressed in plant cells**. *Plant Mol Biol* 66, 61-72.
- Brunette, M. G., Vigneault, N., und Carriere, S. (1978). **Magnesium handling by the papilla of the young rat**. *Pflugers Arch* 373, 229-235.
- Carter, R. N., Tolhurst, G., Walmsley, G., Vizuite-Forster, M., Miller, N., und Mahaut-Smith, M. P. (2006). **Molecular and electrophysiological characterization of transient receptor potential ion channels in the primary murine megakaryocyte**. *J Physiol* 576, 151-162.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., und Julius, D. (1997). **The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway**. *Nature* 389, 816-824.
- Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., und Julius, D. (1999). **A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat**. *Nature* 398, 436-441.
- Cefaratti, C., Romani, A., und Scarpa, A. (1998). **Characterization of two Mg²⁺ transporters in sealed plasma membrane vesicles from rat liver**. *Am J Physiol* 275, C995-C1008.
- Chuang, H. H., Neuhausser, W. M., und Julius, D. (2004). **The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel**. *Neuron* 43, 859-869.
- Chubanov, V., Waldegger, S., Mederos y Schnitzler, M., Vitzthum, H., Sassen, M. C., Seyberth, H. W., Konrad, M., und Gudermann, T. (2004). **Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2894-2899.
- Chubanov, V., Mederos y Schnitzler, M., Waring, J., Plank, A., und Gudermann, T. (2005). **Emerging roles of TRPM6/TRPM7 channel kinase signal transduction complexes**. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371, 334-341.

- Chubanov, V., Schlingmann, K. P., Waring, J., Heininger, J., Kaske, S., Waldegger, S., Schnitzler, M. M., und Gudermann, T. (2007). **Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia due to a missense mutation in the putative pore-forming region of TRPM6**. *J Biol Chem* 282, 7656-7667.
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., und Strubing, C. (2001). **The TRP ion channel family**. *Nat Rev Neurosci* 2, 387-396.
- Clapham, D. E. (2002). **Sorting out MIC, TRP, and CRAC ion channels**. *J Gen Physiol* 120, 217-220.
- Clapham, D. E., Montell, C., Schultz, G., und Julius, D. (2003). **International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels**. *Pharmacol Rev* 55, 591-596.
- Clark, K., Langeslag, M., van Leeuwen, B., Ran, L., Ryazanov, A. G., Figdor, C. G., Moolenaar, W. H., Jalink, K., und van Leeuwen, F. N. (2006). **TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion**. *Embo J* 25, 290-301.
- Cole, D. E., und Quamme, G. A. (2000). **Inherited disorders of renal magnesium handling**. *J Am Soc Nephrol* 11, 1937-1947.
- Cosens, D. J., und Manning, A. (1969). **Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant**. *Nature* 224, 285-287.
- Dai, L. J., Raymond, L., Friedman, P. A., und Quamme, G. A. (1997). **Mechanisms of amiloride stimulation of Mg^{2+} uptake in immortalized mouse distal convoluted tubule cells**. *Am J Physiol* 272, F249-256.
- Dai, L. J., Ritchie, G., Kerstan, D., Kang, H. S., Cole, D. E., und Quamme, G. A. (2001). **Magnesium transport in the renal distal convoluted tubule**. *Physiol Rev* 81, 51-84.
- Dalal, P., Romani, A., und Scarpa, A. (1998). **Redistribution of Mg^{2+} in isolated rat hepatocytes upon chemical hypoxia**. *Biophys J* 74, A193.
- De Rouffignac, C., Di Stefano, A., Wittner, M., Roinel, N., und Elalouf, J. M. (1991). **Consequences of differential effects of ADH and other peptide hormones on thick ascending limb of mammalian kidney**. *Am J Physiol* 260, R1023-1035.
- Demeuse, P., Penner, R., und Fleig, A. (2006). **TRPM7 channel is regulated by magnesium nucleotides via its kinase domain**. *J Gen Physiol* 127, 421-434.
- Denis, V., und Cyert, M. S. (2002). **Internal Ca^{2+} release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue**. *J Cell Biol* 156, 29-34.
- Di Francesco, A., Desnoyer, R. W., Covacci, V., Wolf, F. I., Romani, A., Cittadini, A., und Bond, M. (1998). **Changes in magnesium content and subcellular distribution during retinoic acid-induced differentiation of HL60 cells**. *Arch Biochem Biophys* 360, 149-157.
- Di Stefano, A., Roinel, N., de Rouffignac, C., und Wittner, M. (1993). **Transepithelial Ca^{2+} and Mg^{2+} transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of the mouse is a voltage-dependent process**. *Ren Physiol Biochem* 16, 157-166.
- Dorovkov, M. V., und Ryazanov, A. G. (2004). **Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase**. *J Biol Chem* 279, 50643-50646.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., und MacKinnon, R. (1998). **The structure of the potassium channel: molecular basis of K^{+} conduction and selectivity**. *Science* 280, 69-77.
- Duncan, L. M., Deeds, J., Hunter, J., Shao, J., Holmgren, L. M., Woolf, E. A., Tepper, R. I., und Shyjan, A. W. (1998). **Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis**. *Cancer Res* 58, 1515-1520.
- Ellinor, P. T., Yang, J., Sather, W. A., Zhang, J. F., und Tsien, R. W. (1995). **Ca^{2+} channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca^{2+} interactions**. *Neuron* 15, 1121-1132.
- Estevez, A. Y., Roberts, R. K., und Strange, K. (2003). **Identification of store-independent and store-operated Ca^{2+} conductances in Caenorhabditis elegans intestinal epithelial cells**. *J Gen Physiol* 122, 207-223.

- Feray, J. C., und Garay, R. (1987). **A one-to-one Mg^{2+} : Mn^{2+} exchange in rat erythrocytes.** J Biol Chem 262, 5763-5768.
- Fine, K. D., Santa Ana, C. A., Porter, J. L., und Fordtran, J. S. (1991). **Intestinal absorption of magnesium from food and supplements.** J Clin Invest 88, 396-402.
- Flatman, P. W. (1984). **Magnesium transport across cell membranes.** J Membr Biol 80, 1-14.
- Flatman, P. W. (1991). **Mechanisms of magnesium transport.** Annu Rev Physiol 53, 259-271.
- Fonfria, E., Marshall, I. C., Boyfield, I., Skaper, S. D., Hughes, J. P., Owen, D. E., Zhang, W., Miller, B. A., Benham, C. D., und McNulty, S. (2005). **Amyloid beta-peptide(1-42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures.** J Neurochem 95, 715-723.
- Fuessel, S., Sickert, D., Meye, A., Klenk, U., Schmidt, U., Schmitz, M., Rost, A. K., Weigle, B., Kiessling, A., und Wirth, M. P. (2003). **Multiple tumor marker analyses (PSA, hK2, PSCA, trp-p8) in primary prostate cancers using quantitative RT-PCR.** Int J Oncol 23, 221-228.
- Furney, S. J., Alba, M. M., und Lopez-Bigas, N. (2006). **Differences in the evolutionary history of disease genes affected by dominant or recessive mutations.** BMC Genomics 7, 165.
- Garcia-Martinez, C., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Merino, J. M., und Ferrer-Montiel, A. (2000). **Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties.** J Biol Chem 275, 32552-32558.
- Gasser, A., Glassmeier, G., Fliegert, R., Langhorst, M. F., Meinke, S., Hein, D., Kruger, S., Weber, K., Heiner, I., Oppenheimer, N., *et al.* (2006). **Activation of T cell calcium influx by the second messenger ADP-ribose.** J Biol Chem 281, 2489-2496.
- Geven, W. B., Monnens, L. A., und Willems, J. L. (1993). **Magnesium metabolism in childhood.** Miner Electrolyte Metab 19, 308-313.
- Goel, M., Sinkins, W. G., und Schilling, W. P. (2002). **Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes.** J Biol Chem 277, 48303-48310.
- Grimm, C., Kraft, R., Sauerbruch, S., Schultz, G., und Harteneck, C. (2003). **Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3.** J Biol Chem 278, 21493-21501.
- Groenestege, W. M., Hoenderop, J. G., van den Heuvel, L., Knoers, N., und Bindels, R. J. (2006). **The epithelial Mg^{2+} channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg^{2+} content and estrogens.** J Am Soc Nephrol 17, 1035-1043.
- Grubbs, R. D., und Maguire, M. E. (1987). **Magnesium as a regulatory cation: criteria and evaluation.** Magnesium 6, 113-127.
- Grunder, S., Jaeger, N. F., Gautschi, I., Schild, L., und Rossier, B. C. (1999). **Identification of a highly conserved sequence at the N-terminus of the epithelial Na^+ channel alpha subunit involved in gating.** Pflugers Arch 438, 709-715.
- Gunther, T., Vormann, J., und Forster, R. (1984). **Mechanism of the increased cardiac Ca^{2+} uptake induced by isoprenaline in DOCA-salt pretreated rats.** Arzneimittelforschung 34, 26-29.
- Gunther, T., und Vormann, J. (1985). **Mg^{2+} efflux is accomplished by an amiloride-sensitive Na^+ / Mg^{2+} antiport.** Biochem Biophys Res Commun 130, 540-545.
- Gunther, T. (1993). **Mechanisms and regulation of Mg^{2+} efflux and Mg^{2+} influx.** Miner Electrolyte Metab 19, 259-265.
- Gunther, T., und Holtriagl, V. (1993). **$Na^{(+)}$ - and anion-dependent Mg^{2+} influx in isolated hepatocytes.** Biochim Biophys Acta 1149, 49-54.
- Gunther, T. (2007). **Total and free Mg^{2+} contents in erythrocytes: a simple but still undisclosed cell model.** Magnes Res 20, 161-167.

- Gwanyanya, A., Sipido, K. R., Vereecke, J., und Mubagwa, K. (2006). **ATP and PIP₂ dependence of the magnesium-inhibited, TRPM7-like cation channel in cardiac myocytes.** *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C627-635.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., und Sigworth, F. J. (1981). **Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.** *Pflügers Arch* 391, 85-100.
- Hanano, T., Hara, Y., Shi, J., Morita, H., Umebayashi, C., Mori, E., Sumimoto, H., Ito, Y., Mori, Y., und Inoue, R. (2004). **Involvement of TRPM7 in cell growth as a spontaneously activated Ca²⁺ entry pathway in human retinoblastoma cells.** *J Pharmacol Sci* 95, 403-419.
- Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J., *et al.* (2002). **LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death.** *Mol Cell* 9, 163-173.
- Harteneck, C., Plant, T. D., und Schultz, G. (2000). **From worm to man: three subfamilies of TRP channels.** *Trends Neurosci* 23, 159-166.
- He, Y., Yao, G., Savoia, C., und Touyz, R. M. (2005). **Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angiotensin II.** *Circ Res* 96, 207-215.
- Heginbotham, L., Abramson, T., und MacKinnon, R. (1992). **A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels.** *Science* 258, 1152-1155.
- Heiner, I., Eisfeld, J., und Luckhoff, A. (2003). **Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes.** *Cell Calcium* 33, 533-540.
- Hoenderop, J. G., van Leeuwen, J. P., van der Eerden, B. C., Kersten, F. F., van der Kemp, A. W., Merillat, A. M., Waarsing, J. H., Rossier, B. C., Vallon, V., Hummler, E., und Bindels, R. J. (2003a). **Renal Ca²⁺ wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5.** *J Clin Invest* 112, 1906-1914.
- Hoenderop, J. G., Voets, T., Hoefs, S., Weidema, F., Prenen, J., Nilius, B., und Bindels, R. J. (2003b). **Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6.** *Embo J* 22, 776-785.
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., und Gudermann, T. (2002). **Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7461-7466.
- Hsu, Y. J., Hoenderop, J. G., und Bindels, R. J. (2007). **TRP channels in kidney disease.** *Biochim Biophys Acta* 1772, 928-936.
- Inamura, K., Sano, Y., Mochizuki, S., Yokoi, H., Miyake, A., Nozawa, K., Kitada, C., Matsushime, H., und Furuichi, K. (2003). **Response to ADP-ribose by activation of TRPM2 in the CRI-G1 insulinoma cell line.** *J Membr Biol* 191, 201-207.
- Jalkanen, R., Pronicka, E., Tyynismaa, H., Hanauer, A., Walder, R., und Alitalo, T. (2006). **Genetic background of HSH in three Polish families and a patient with an X;9 translocation.** *Eur J Hum Genet* 14, 55-62.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B. T., und MacKinnon, R. (2003). **X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel.** *Nature* 423, 33-41.
- Jiang, J., Li, M., und Yue, L. (2005). **Potentiation of TRPM7 inward currents by protons.** *J Gen Physiol* 126, 137-150.
- Jung, S., Muhle, A., Schaefer, M., Strotmann, R., Schultz, G., und Plant, T. D. (2003). **Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth.** *J Biol Chem* 278, 3562-3571.
- Kass, R. S. (2005). **The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease.** *J Clin Invest* 115, 1986-1989.
- Kerschbaum, H. H., Kozak, J. A., und Cahalan, M. D. (2003). **Polyvalent cations as permeant probes of MIC and TRPM7 pores.** *Biophys J* 84, 2293-2305.

- Kerschensteiner, D., Soto, F., und Stocker, M. (2005). **Fluorescence measurements reveal stoichiometry of K⁺ channels formed by modulatory and delayed rectifier alpha-subunits.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6160-6165.
- Kerstan, D., und Quamme, G. (2002). **Physiology and pathophysiology of intestinal absorption of magnesium.** In *Calcium in Internal Medicine*, S. G. Massry, H. Morii, und Y. Nishizawa, eds., pp. 171-183.
- Kimberling, W. J., Fain, P. R., Kenyon, J. B., Goldgar, D., Sujansky, E., und Gabow, P. A. (1988). **Linkage heterogeneity of autosomal dominant polycystic kidney disease.** *N Engl J Med* 319, 913-918.
- King, N., Westbrook, M. J., Young, S. L., Kuo, A., Abedin, M., Chapman, J., Fairclough, S., Hellsten, U., Isogai, Y., Letunic, I., *et al.* (2008). **The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans.** *Nature* 451, 783-788.
- Kolisek, M., Beck, A., Fleig, A., und Penner, R. (2005). **Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels.** *Mol Cell* 18, 61-69.
- Konrad, M., Schlingmann, K. P., und Gudermann, T. (2004). **Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis.** *Am J Physiol Renal Physiol* 286, F599-605.
- Kraft, R., Grimm, C., Grosse, K., Hoffmann, A., Sauerbruch, S., Kettenmann, H., Schultz, G., und Harteneck, C. (2004). **Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia.** *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C129-137.
- Kramer, J. W., Post, M. A., Brown, A. M., und Kirsch, G. E. (1998). **Modulation of potassium channel gating by coexpression of Kv2.1 with regulatory Kv5.1 or Kv6.1 alpha-subunits.** *Am J Physiol* 274, C1501-1510.
- Kuhn, F. J., und Luckhoff, A. (2004). **Sites of the NUDT9-H domain critical for ADP-ribose activation of the cation channel TRPM2.** *J Biol Chem* 279, 46431-46437.
- Kunert-Keil, C., Bisping, F., Kruger, J., und Brinkmeier, H. (2006). **Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains.** *BMC Genomics* 7, 159.
- Launay, P., Fleig, A., Perraud, A. L., Scharenberg, A. M., Penner, R., und Kinet, J. P. (2002). **TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization.** *Cell* 109, 397-407.
- Lee, N., Chen, J., Sun, L., Wu, S., Gray, K. R., Rich, A., Huang, M., Lin, J. H., Feder, J. N., Janovitz, E. B., *et al.* (2003). **Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3).** *J Biol Chem* 278, 20890-20897.
- Lennon, E. J., und Piering, W. F. (1970). **A comparison of the effects of glucose ingestion and NH₄Cl acidosis on urinary calcium and magnesium excretion in man.** *J Clin Invest* 49, 1458-1465.
- Lewis, C. A. (1979). **Ion-concentration dependence of the reversal potential and the single channel conductance of ion channels at the frog neuromuscular junction.** *J Physiol* 286, 417-445.
- Li, M., Jiang, J., und Yue, L. (2006). **Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7.** *J Gen Physiol* 127, 525-537.
- Li, M., Du, J., Jiang, J., Ratzan, W. J., Su, L. T., Runnels, L. W., und Yue, L. (2007). **Molecular determinants of Mg²⁺ and Ca²⁺ permeability and pH sensitivity in TRPM6 and TRPM7.** *J Biol Chem*.
- Liman, E. R., Tytgat, J., und Hess, P. (1992). **Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs.** *Neuron* 9, 861-871.
- Liu, C. H., Wang, T., Postma, M., Obukhov, A. G., Montell, C., und Hardie, R. C. (2007). **In vivo identification and manipulation of the Ca²⁺ selectivity filter in the *Drosophila* transient receptor potential channel.** *J Neurosci* 27, 604-615.

- Lombeck, I., Ritzl, F., Schnippering, H. G., Michael, H., Bremer, H. J., Feinendegen, L. E., und Kosenow, W. (1975). **Primary hypomagnesemia. I. Absorption Studies.** *Z Kinderheilkd* 118, 249-258.
- Mandon, B., Siga, E., Roinel, N., und de Rouffignac, C. (1993). **Ca²⁺, Mg²⁺ and K⁺ transport in the cortical and medullary thick ascending limb of the rat nephron: influence of transepithelial voltage.** *Pflugers Arch* 424, 558-560.
- Maroto, R., Raso, A., Wood, T. G., Kurosky, A., Martinac, B., und Hamill, O. P. (2005). **TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells.** *Nat Cell Biol* 7, 179-185.
- Martin, H. E., und Jones, R. (1961). **The effect of ammonium chloride and sodium bicarbonate on the urinary excretion of magnesium, calcium, and phosphate.** *Am Heart J* 62, 206-210.
- Maruoka, T., Nagasoe, Y., Inoue, S., Mori, Y., Goto, J., Ikeda, M., und Iida, H. (2002). **Essential hydrophilic carboxyl-terminal regions including cysteine residues of the yeast stretch-activated calcium-permeable channel Mid1.** *J Biol Chem* 277, 11645-11652.
- Maruyama, Y., Ogura, T., Mio, K., Kiyonaka, S., Kato, K., Mori, Y., und Sato, C. (2007). **Three-dimensional reconstruction using transmission electron microscopy reveals a swollen, bell-shaped structure of transient receptor potential melastatin type 2 cation channel.** *J Biol Chem* 282, 36961-36970.
- Massry, S. G., Coburn, J. W., Chapman, L. W., und Kleeman, C. R. (1967). **Effect of NaCl infusion on urinary Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ during reduction in their filtered loads.** *Am J Physiol* 213, 1218-1224.
- Matsushita, M., Kozak, J. A., Shimizu, Y., McLachlin, D. T., Yamaguchi, H., Wei, F. Y., Tomizawa, K., Matsui, H., Chait, B. T., Cahalan, M. D., und Nairn, A. C. (2005). **Channel function is dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/ChaK1.** *J Biol Chem* 280, 20793-20803.
- McHugh, D., Flemming, R., Xu, S. Z., Perraud, A. L., und Beech, D. J. (2003). **Critical intracellular Ca²⁺ dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation.** *J Biol Chem* 278, 11002-11006.
- McKemy, D. D., Neuhauser, W. M., und Julius, D. (2002). **Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation.** *Nature* 416, 52-58.
- McNamara, F. N., Randall, A., und Gunthorpe, M. J. (2005). **Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1).** *Br J Pharmacol* 144, 781-790.
- McQuillin, A., Bass, N. J., Kalsi, G., Lawrence, J., Puri, V., Choudhury, K., Detera-Wadleigh, S. D., Curtis, D., und Gurling, H. M. (2006). **Fine mapping of a susceptibility locus for bipolar and genetically related unipolar affective disorders, to a region containing the C21ORF29 and TRPM2 genes on chromosome 21q22.3.** *Mol Psychiatry* 11, 134-142.
- Michelis, M. F., Bragdon, R. W., Fusco, R. D., Eichenholz, A., und Davis, B. B. (1975). **Parathyroid hormone responsiveness in hypoparathyroidism with hypomagnesemia.** *Am J Med Sci* 270, 412-418.
- Milla, P. J., Aggett, P. J., Wolff, O. H., und Harries, J. T. (1979). **Studies in primary hypomagnesaemia: evidence for defective carrier-mediated small intestinal transport of magnesium.** *Gut* 20, 1028-1033.
- Monteilh-Zoller, M. K., Hermosura, M. C., Nadler, M. J., Scharenberg, A. M., Penner, R., und Fleig, A. (2003). **TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions.** *J Gen Physiol* 121, 49-60.
- Montell, C. (2003). **Mg²⁺ homeostasis: the Mg²⁺-nifentidyl TRPM channels.** *Curr Biol* 13, R799-801.
- Montell, C. (2005). **The TRP superfamily of cation channels.** *Sci STKE* 2005, re3.
- Montell, C., und Rubin, G. M. (1989). **Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction.** *Neuron* 2, 1313-1323.
- Montell, C., Birnbaumer, L., und Flockerzi, V. (2002a). **The TRP channels, a remarkably functional family.** *Cell* 108, 595-598.

- Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R. J., Bruford, E. A., Caterina, M. J., Clapham, D. E., Harteneck, C., Heller, S., Julius, D., *et al.* (2002b). **A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels.** *Mol Cell* 9, 229-231.
- Moqrich, A., Hwang, S. W., Earley, T. J., Petrus, M. J., Murray, A. N., Spencer, K. S., Andahazy, M., Story, G. M., und Patapoutian, A. (2005). **Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin.** *Science* 307, 1468-1472.
- Nadler, M. J., Hermosura, M. C., Inabe, K., Perraud, A. L., Zhu, Q., Stokes, A. J., Kurosaki, T., Kinet, J. P., Penner, R., Scharenberg, A. M., und Fleig, A. (2001). **LTRPC7 is a Mg²⁺-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability.** *Nature* 411, 590-595.
- Nagamine, K., Kudoh, J., Minoshima, S., Kawasaki, K., Asakawa, S., Ito, F., und Shimizu, N. (1998). **Molecular cloning of a novel putative Ca²⁺ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain.** *Genomics* 54, 124-131.
- Nijenhuis, T., Renkema, K. Y., Hoenderop, J. G., und Bindels, R. J. (2006). **Acid-base status determines the renal expression of Ca²⁺ and Mg²⁺ transport proteins.** *J Am Soc Nephrol* 17, 617-626.
- Nilius, B., Vennekens, R., Prenen, J., Hoenderop, J. G., Droogmans, G., und Bindels, R. J. (2001). **The single pore residue Asp542 determines Ca²⁺ permeation and Mg²⁺ block of the epithelial Ca²⁺ channel.** *J Biol Chem* 276, 1020-1025.
- Nilius, B., und Voets, T. (2005). **TRP channels: a TRP through a world of multifunctional cation channels.** *Pflügers Arch* 451, 1-10.
- Nilius, B., Prenen, J., Janssens, A., Owsianik, G., Wang, C., Zhu, M. X., und Voets, T. (2005a). **The selectivity filter of the cation channel TRPM4.** *J Biol Chem* 280, 22899-22906.
- Nilius, B., Voets, T., und Peters, J. (2005b). **TRP channels in disease.** *Sci STKE* 2005, re8.
- Nordio, S., Donath, A., Macagno, F., und Gatti, R. (1971). **Chronic hypomagnesemia with magnesium-dependent hypocalcemia. I. A new syndrome with intestinal magnesium malabsorption.** *Acta Paediatr Scand* 60, 441-448.
- Numata, T., Shimizu, T., und Okada, Y. (2007a). **Direct mechano-stress sensitivity of TRPM7 channel.** *Cell Physiol Biochem* 19, 1-8.
- Numata, T., Shimizu, T., und Okada, Y. (2007b). **TRPM7 is a stretch- and swelling-activated cation channel involved in volume regulation in human epithelial cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C460-467.
- Oberwinkler, J., Lis, A., Giehl, K. M., Flockerzi, V., und Philipp, S. E. (2005). **Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels.** *J Biol Chem* 280, 22540-22548.
- Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., und Nilius, B. (2006). **Permeation and selectivity of TRP channels.** *Annu Rev Physiol* 68, 685-717.
- Palmer, C. P., Zhou, X. L., Lin, J., Loukin, S. H., Kung, C., und Saimi, Y. (2001). **A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca²⁺-permeable channel in the yeast vacuolar membrane.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7801-7805.
- Paolisso, G., Scheen, A., D'Onofrio, F., und Lefebvre, P. (1990). **Magnesium and glucose homeostasis.** *Diabetologia* 33, 511-514.
- Paunier, L., Radde, I. C., Kooh, S. W., Conen, P. E., und Fraser, D. (1968). **Primary hypomagnesemia with secondary hypocalcemia in an infant.** *Pediatrics* 41, 385-402.
- Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., Earley, T. J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., und Patapoutian, A. (2002). **A TRP channel that senses cold stimuli and menthol.** *Cell* 108, 705-715.
- Penner, R., und Fleig, A. (2007). **The Mg²⁺ and Mg²⁺-nucleotide-regulated channel-kinase TRPM7.** *Handb Exp Pharmacol*, 313-328.

- Perez, C. A., Huang, L., Rong, M., Kozak, J. A., Preuss, A. K., Zhang, H., Max, M., und Margolskee, R. F. (2002). **A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells.** *Nat Neurosci* 5, 1169-1176.
- Perraud, A. L., Fleig, A., Dunn, C. A., Bagley, L. A., Launay, P., Schmitz, C., Stokes, A. J., Zhu, Q., Bessman, M. J., Penner, R., *et al.* (2001). **ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology.** *Nature* 411, 595-599.
- Prakriya, M., und Lewis, R. S. (2002). **Separation and characterization of currents through store-operated CRAC channels and Mg^{2+} -inhibited cation (MIC) channels.** *J Gen Physiol* 119, 487-507.
- Quamme, G. A. (1982). **Effect of hypercalcemia on renal tubular handling of calcium and magnesium.** *Can J Physiol Pharmacol* 60, 1275-1280.
- Quamme, G. A. (1989). **Control of magnesium transport in the thick ascending limb.** *Am J Physiol* 256, F197-210.
- Quamme, G. A. (1997). **Renal magnesium handling: new insights in understanding old problems.** *Kidney Int* 52, 1180-1195.
- Quamme, G. A., und de Rouffignac, C. (2000). **Epithelial magnesium transport and regulation by the kidney.** *Front Biosci* 5, D694-711.
- Reintanz, B., Szyroki, A., Ivashikina, N., Ache, P., Godde, M., Becker, D., Palme, K., und Hedrich, R. (2002). **AtKC1, a silent Arabidopsis potassium channel alpha -subunit modulates root hair K^+ influx.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4079-4084.
- Reiser, J., Polu, K. R., Moller, C. C., Kenlan, P., Altintas, M. M., Wei, C., Faul, C., Herbert, S., Villegas, I., Avila-Casado, C., *et al.* (2005). **TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function.** *Nat Genet* 37, 739-744.
- Romani, A., und Scarpa, A. (1992). **Regulation of cell magnesium.** *Arch Biochem Biophys* 298, 1-12.
- Romani, A., Marfella, C., und Scarpa, A. (1993). **Regulation of magnesium uptake and release in the heart and in isolated ventricular myocytes.** *Circ Res* 72, 1139-1148.
- Romani, A. M., und Scarpa, A. (2000). **Regulation of cellular magnesium.** *Front Biosci* 5, D720-734.
- Romani, A. M. (2007). **Magnesium homeostasis in mammalian cells.** *Front Biosci* 12, 308-331.
- Rude, R. K., Oldham, S. B., und Singer, F. R. (1976). **Functional hypoparathyroidism and parathyroid hormone end-organ resistance in human magnesium deficiency.** *Clin Endocrinol (Oxf)* 5, 209-224.
- Runnels, L. W., Yue, L., und Clapham, D. E. (2001). **TRP-PLIK, a bifunctional protein with kinase and ion channel activities.** *Science* 291, 1043-1047.
- Runnels, L. W., Yue, L., und Clapham, D. E. (2002). **The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis.** *Nat Cell Biol* 4, 329-336.
- Ryazanov, A. G. (2002). **Elongation factor-2 kinase and its newly discovered relatives.** *FEBS Lett* 514, 26-29.
- Ryazanova, L. V., Pavur, K. S., Petrov, A. N., Dorovkov, M. V., und Riazanov, A. G. (2001). **[Novel type of signaling molecules: protein kinases covalently linked to ion channels].** *Mol Biol (Mosk)* 35, 321-332.
- Ryazanova, L. V., Dorovkov, M. V., Ansari, A., und Ryazanov, A. G. (2004). **Characterization of the protein kinase activity of TRPM7/ChaK1, a protein kinase fused to the transient receptor potential ion channel.** *J Biol Chem* 279, 3708-3716.
- Saito, S., und Shingai, R. (2006). **Evolution of thermoTRP ion channel homologs in vertebrates.** *Physiol Genomics* 27, 219-230.
- Salinas, M., Duprat, F., Heurteaux, C., Hugnot, J. P., und Lazdunski, M. (1997). **New modulatory alpha subunits for mammalian Shab K^+ channels.** *J Biol Chem* 272, 24371-24379.

- Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Yokoi, H., Matsushime, H., und Furuichi, K. (2001). **Immunocyte Ca^{2+} influx system mediated by LTRPC2**. *Science* 293, 1327-1330.
- Satoh, J., und Romero, M. F. (2002). **Mg^{2+} transport in the kidney**. *Biometals* 15, 285-295.
- Schlingmann, K. P., Weber, S., Peters, M., Niemann Nejsum, L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D., *et al.* (2002). **Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family**. *Nat Genet* 31, 166-170.
- Schlingmann, K. P., und Gudermann, T. (2005). **A critical role of TRPM channel-kinase for human magnesium transport**. *J Physiol* 566, 301-308.
- Schlingmann, K. P., Sassen, M. C., Weber, S., Pechmann, U., Kusch, K., Pelken, L., Lotan, D., Syrrou, M., Prebble, J. J., Cole, D. E., *et al.* (2005). **Novel TRPM6 mutations in 21 families with primary hypomagnesemia and secondary hypocalcemia**. *J Am Soc Nephrol* 16, 3061-3069.
- Schlingmann, K. P., Waldegger, S., Konrad, M., Chubanov, V., und Gudermann, T. (2007). **TRPM6 and TRPM7-Gatekeepers of human magnesium metabolism**. *Biochim Biophys Acta* 1772, 813-821.
- Schmitz, C., Perraud, A. L., Johnson, C. O., Inabe, K., Smith, M. K., Penner, R., Kurosaki, T., Fleig, A., und Scharenberg, A. M. (2003). **Regulation of vertebrate cellular Mg^{2+} homeostasis by TRPM7**. *Cell* 114, 191-200.
- Schmitz, C., Dorovkov, M. V., Zhao, X., Davenport, B. J., Ryazanov, A. G., und Perraud, A. L. (2005). **The channel kinases TRPM6 and TRPM7 are functionally nonredundant**. *J Biol Chem* 280, 37763-37771.
- Schmitz, C., Deason, F., und Perraud, A. L. (2007). **Molecular components of vertebrate Mg^{2+} -homeostasis regulation**. *Magnes Res* 20, 6-18.
- Seelig, M. S. (1982). **Magnesium requirements in human nutrition**. *J Med Soc N J* 79, 849-850.
- Sgambato, A., Faraglia, B., Ardito, R., Torsello, A., Boninsegna, A., Cittadini, A., und Wolf, F. I. (2001). **Isolation of normal epithelial cells adapted to grow at nonphysiological concentration of magnesium**. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 752-757.
- Shalev, H., Phillip, M., Galil, A., Carmi, R., und Landau, D. (1998). **Clinical presentation and outcome in primary familial hypomagnesaemia**. *Arch Dis Child* 78, 127-130.
- Shareghi, G. R., und Agus, Z. S. (1982). **Magnesium transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of the rabbit**. *J Clin Invest* 69, 759-769.
- Sharif-Naeini, R., Dedman, A., Folgering, J. H., Duprat, F., Patel, A., Nilius, B., und Honoré, E. (2008). **TRP channels and mechanosensory transduction: insights into the arterial myogenic response**. *Pflugers Arch*.
- Shi, N., Ye, S., Alam, A., Chen, L., und Jiang, Y. (2006). **Atomic structure of a Na^{+} - and K^{+} -conducting channel**. *Nature* 440, 570-574.
- Simon, D. B., Lu, Y., Choate, K. A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., *et al.* (1999). **Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption**. *Science* 285, 103-106.
- Soboloff, J., Spassova, M., Hewavitharana, T., He, L. P., Luncsford, P., Xu, W., Venkatachalam, K., van Rossum, D., Patterson, R. L., und Gill, D. L. (2007). **TRPC channels: integrators of multiple cellular signals**. *Handb Exp Pharmacol*, 575-591.
- Somlyo, A. V., McClellan, G., Gonzalez-Serratos, H., und Somlyo, A. P. (1985). **Electron probe X-ray microanalysis of post-tetanic Ca^{2+} and Mg^{2+} movements across the sarcoplasmic reticulum in situ**. *J Biol Chem* 260, 6801-6807.
- Spassova, M. A., Hewavitharana, T., Xu, W., Soboloff, J., und Gill, D. L. (2006). **A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16586-16591.
- Stocker, M., Hellwig, M., und Kerscheneiner, D. (1999). **Subunit assembly and domain analysis of electrically silent K^{+} channel alpha-subunits of the rat Kv9 subfamily**. *J Neurochem* 72, 1725-1734.

- Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Andersson, D. A., Hwang, S. W., *et al.* (2003). **ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures.** *Cell* 112, 819-829.
- Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., und Clapham, D. E. (2001). **TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain.** *Neuron* 29, 645-655.
- Su, L. T., Agapito, M. A., Li, M., Simonson, W. T., Huttenlocher, A., Habas, R., Yue, L., und Runnels, L. W. (2006). **TRPM7 regulates cell adhesion by controlling the calcium-dependent protease calpain.** *J Biol Chem* 281, 11260-11270.
- Takaya, J., Higashino, H., und Kobayashi, Y. (2000). **Can magnesium act as a second messenger? Current data on translocation induced by various biologically active substances.** *Magnes Res* 13, 139-146.
- Takezawa, R., Schmitz, C., Demeuse, P., Scharenberg, A. M., Penner, R., und Fleig, A. (2004). **Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6009-6014.
- Tani, D., Monteilh-Zoller, M. K., Fleig, A., und Penner, R. (2007). **Cell cycle-dependent regulation of store-operated I(CRAC) and Mg²⁺-nucleotide-regulated MagNuM (TRPM7) currents.** *Cell Calcium* 41, 249-260.
- Teramoto, T., Lambie, E. J., und Iwasaki, K. (2005). **Differential regulation of TRPM channels governs electrolyte homeostasis in the C. elegans intestine.** *Cell Metab* 1, 343-354.
- Tobin, D., Madsen, D., Kahn-Kirby, A., Peckol, E., Moulder, G., Barstead, R., Maricq, A., und Bargmann, C. (2002). **Combinatorial expression of TRPV channel proteins defines their sensory functions and subcellular localization in C. elegans neurons.** *Neuron* 35, 307-318.
- Topala, C. N., Groenestege, W. T., Thebault, S., van den Berg, D., Nilius, B., Hoenderop, J. G., und Bindels, R. J. (2007). **Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPM6.** *Cell Calcium* 41, 513-523.
- Touyz, R. M., He, Y., Montezano, A. C., Yao, G., Chubakov, V., Gudermann, T., und Callera, G. E. (2006). **Differential regulation of transient receptor potential melastatin 6 and 7 cation channels by ANG II in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, R73-78.
- Tsavalier, L., Shaper, M. H., Morkowski, S., und Laus, R. (2001). **Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins.** *Cancer Res* 61, 3760-3769.
- Velazquez, H., Naray-Fejes-Toth, A., Silva, T., Andujar, E., Reilly, R. F., Desir, G. V., und Ellison, D. H. (1998). **Rabbit distal convoluted tubule coexpresses NaCl cotransporter and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase II mRNA.** *Kidney Int* 54, 464-472.
- Venkatachalam, K., van Rossum, D. B., Patterson, R. L., Ma, H. T., und Gill, D. L. (2002). **The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry.** *Nat Cell Biol* 4, E263-272.
- Venkatachalam, K., und Montell, C. (2007). **TRP channels.** *Annu Rev Biochem* 76, 387-417.
- Vetter, T., und Lohse, M. J. (2002). **Magnesium and the parathyroid.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11, 403-410.
- Voets, T., Janssens, A., Droogmans, G., und Nilius, B. (2004a). **Outer pore architecture of a Ca²⁺-selective TRP channel.** *J Biol Chem* 279, 15223-15230.
- Voets, T., Nilius, B., Hoefs, S., van der Kemp, A. W., Droogmans, G., Bindels, R. J., und Hoenderop, J. G. (2004b). **TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption.** *J Biol Chem* 279, 19-25.
- Voets, T., Prenen, J., Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Wissenbach, U., Bodding, M., Droogmans, G., und Nilius, B. (2002). **Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4.** *J Biol Chem* 277, 33704-33710.

- Vriens, J., Owsianik, G., Voets, T., Droogmans, G., und Nilius, B. (2004). **Invertebrate TRP proteins as functional models for mammalian channels.** *Pflügers Arch* 449, 213-226.
- Walder, R. Y., Landau, D., Meyer, P., Shalev, H., Tsolia, M., Borochowitz, Z., Boettger, M. B., Beck, G. E., Englehardt, R. K., Carmi, R., und Sheffield, V. C. (2002). **Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia.** *Nat Genet* 31, 171-174.
- Walder, R. Y., Shalev, H., Brennan, T. M., Carmi, R., Elbedour, K., Scott, D. A., Hanauer, A., Mark, A. L., Patil, S., Stone, E. M., und Sheffield, V. C. (1997). **Familial hypomagnesemia maps to chromosome 9q, not to the X chromosome: genetic linkage mapping and analysis of a balanced translocation breakpoint.** *Hum Mol Genet* 6, 1491-1497.
- Wehage, E., Eisfeld, J., Heiner, I., Jungling, E., Zitt, C., und Luckhoff, A. (2002). **Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose.** *J Biol Chem* 277, 23150-23156.
- Wilding, M., Russo, G. L., Galione, A., Marino, M., und Dale, B. (1998). **ADP-ribose gates the fertilization channel in ascidian oocytes.** *Am J Physiol* 275, C1277-1283.
- Wong, N. L., Dirks, J. H., und Quamme, G. A. (1983). **Tubular reabsorptive capacity for magnesium in the dog kidney.** *Am J Physiol* 244, F78-83.
- Wong, N. L., Quamme, G. A., Sutton, R. A., und Dirks, J. H. (1979). **Effects of mannitol on water and electrolyte transport in the dog kidney.** *J Lab Clin Med* 94, 683-692.
- Xu, C., Macciardi, F., Li, P. P., Yoon, I. S., Cooke, R. G., Hughes, B., Parikh, S. V., McIntyre, R. S., Kennedy, J. L., und Warsh, J. J. (2006). **Association of the putative susceptibility gene, transient receptor potential protein melastatin type 2, with bipolar disorder.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141, 36-43.
- Xu, H., Blair, N. T., und Clapham, D. E. (2005). **Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism.** *J Neurosci* 25, 8924-8937.
- Xu, X. Z., Moebius, F., Gill, D. L., und Montell, C. (2001). **Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10692-10697.
- Yang, J., Ellinor, P. T., Sather, W. A., Zhang, J. F., und Tsien, R. W. (1993). **Molecular determinants of Ca^{2+} selectivity and ion permeation in L-type Ca^{2+} channels.** *Nature* 366, 158-161.
- Yellen, G. (2002). **The voltage-gated potassium channels and their relatives.** *Nature* 419, 35-42.
- Yu, S. P., und Kerchner, G. A. (1998). **Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells.** *J Neurosci Res* 52, 612-617.
- Zhang, L., und Barritt, G. J. (2004). **Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca^{2+} channel required for the survival of prostate cancer cells.** *Cancer Res* 64, 8365-8373.
- Zhang, W., Chu, X., Tong, Q., Cheung, J. Y., Conrad, K., Masker, K., und Miller, B. A. (2003a). **A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death.** *J Biol Chem* 278, 16222-16229.
- Zhang, W., Hirschler-Laszkiewicz, I., Tong, Q., Conrad, K., Sun, S. C., Penn, L., Barber, D. L., Stahl, R., Carey, D. J., Cheung, J. Y., und Miller, B. A. (2006). **TRPM2 is an ion channel that modulates hematopoietic cell death through activation of caspases and PARP cleavage.** *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C1146-1159.
- Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C. S., und Ryba, N. J. (2003b). **Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways.** *Cell* 112, 293-301.
- Zhu, G., Zhang, Y., Xu, H., und Jiang, C. (1998). **Identification of endogenous outward currents in the human embryonic kidney (HEK 293) cell line.** *J Neurosci Methods* 81, 73-83.

7 ANHANG

Tab. 7.1: Primer zur gezielten Mutagenese nach Stratagene QuikChange
(<http://www.stratagene.com/tradeshows/feature.aspx?fpId=118>)

(s. folgende Seiten)

TRPM6

Mutation	Sense	Primer sequence 5' → 3'
hTRPM6-P1017R	For Rev	TAGCTCGAGATATTGATTTGAGAGAGATACTGGATGATATACGGAGAAG CTTCTCCGTATATCATCCAGTATCTCTCAATACAATATCTCGAGCTA

TRPM7

Mutation	Sense	Primer sequence 5' → 3'
mTRPM7-P1040R	For Rev	GTCTCTTGCTAAAGATATAGTTTTTCATAGATACTGGATGATTTTTGGTGAAGTTTA TAAACTTCACCAAAATCATCCAGTATCTATGAAAACTATATCTTTAGCAAGAGAC
mTRPM7-D1035G	For Rev	CCTTCTTGGTCTCTTGCTAAAGGTATAGTTTTTCATCCATACTGG CCAGTATGGATGAAAAAATCATACCTTTAGCAAGAGACCAAGAAGG
mTRPM7-W1042L	For Rev	CTAAGATATAGTTTTTCATCCATACCTGATGATTTTTGGTGAAGTTTATGCATA TATGCATAAACTTCACCAAAATCATCAAGTATGGATGAAAACTATATCTTTAG
mTRPM7-M1043T	For Rev	GATATAGTTTTTCATCCATACTGGACGATTTTTGGTGAAGTTTATGCATAT ATATGCATAAACTTCACCAAAATCTGCCAGTATGGATGAAAACTATATC
mTRPM7-E1047D	For Rev	CCATCTGGATGATTTTTGGTGGTATTTATGCATATGAAATTTGATGT ACATCAATTTTCATATGCATAAACATCACCAAAAATCATCCAGTATGG
mTRPM7-E1047N	For Rev	TTTCATCCATACTGGATGATTTTTGGTAAATGTTTATGCATATGAAATTTGATGTGTG CACACATCAATTTTCATATGCATAAACATCACCAAAAATCATCCAGTATGGATGAA
mTRPM7-E1047Q	For Rev	CATCCATACTGGATGATTTTTGGTCAAGGTTTATGCATATGAAATTTGATGTGTG CACATCAATTTTCATATGCATAAACCTGACCAAAAATCATCCAGTATGGATG
mTRPM7-Y1049F	For Rev	CATCTGGATGATTTTTGGTGAAGTTTTTGCCATATGAAATTTGATGTGTG CACATCAATTTTCATATGCATAAACCTTCACCAAAAATCATCCAGTATG
mTRPM7-Y1049P	For Rev	CATCCATACTGGATGATTTTTGGTGAAGTTTCTGCATATGAAATTTGATGTGTG CACACATCAATTTTCATATGCATAAACCTTCACCAAAAATCATCCAGTATGGATG
mTRPM7-EVY → QVP	For Rev	TGCTAAAGATATAGTTTTTCATCCATACTGGATGATTTTTGGTCAAGTTCTGCATATGAAATTTGATGTGTGT ACACACATCAATTTTCATATGCATAAACCTGACCAAAAATCATCCAGTATGATGAACTATATCTTTAGCA
mTRPM7-Y1051G	For Rev	CTGGATGATTTTTGGTGAAGTTTTATGCAGGTGAAATTTGATGTGTGTGCAAT ATTTGCACACACATCAATTTTCATCCCTGCATAAACCTTCACCAAAAATCATCCAG
mTRPM7-E1052Q	For Rev	GATTTTGGTGAAGTTTATGCATATCAGATTGATGTGTGTGCAATGACTCC GGAGTCATTTGCACACACATCAATCTGATATGCATAAACCTTCACCAAAAATC
mTRPM7-E1052Y	For Rev	GATTTTGGTGAAGTTTATGCATATTTATGATGATGTGTGTGCAATGACTCC GGAGTCATTTGCACACACATCAATATAATATGCATAAACCTTCACCAAAAATC

TRPM2

Mutation	Sense	Primer sequence 5' → 3'
hTRPM2-Q981E	For Rev	CACCATCTTCGGGGAGATCCCGGGCTA TAGCCCGGGATCTCCCGAAGATGGTG
hTRPM2-P983EY	For Rev	ACCATCTTCGGGCAGATCTATGGCTACATCGACGGTGTG CACACCGTCGATGTAGCCATAGATCTGCCCGAAGATGGT
hTRPM2-Q1E-PIY	For Rev	TACCTCACCATCTTCGGGGAGATCTATGGCTACATCGACGGTGTG CACACCGTCGATGTAGCCATAGATCTCCCGAAGATGGTGAGTA

TRPM8

Mutation	Sense	Primer sequence 5' → 3'
hTRPM8-Q914E	For Rev	GCCATGTTCCGGCGAGGTGCCCAGTG CACTGGGCACCTCGCCGAACATGGC
hTRPM8-P916EY	For Rev	GCCATGTTCCGGCCAGGTGTATAGTGACGTGGATGGTACC GGTACCATCCACGTCACCTATACACCTGGCCGAACATGGC
hTRPM8-QVE-PVY	For Rev	ACCTGGCCATGTTCCGGCGAGGTGTATAGTGACGTGGATGGTAC GTACCATCCACGTCACCTATACACCTCGCCGAACATGGCCAGGT

E R K L Ä R U N G

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Molekulare und evolutionäre Hintergründe der Kationenpermeation bei Mitgliedern der TRPM-Subfamilie“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den.....

.....